



PCT 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 15/12, A61K 38/17, C07K 14/47	(11) 国際公開番号 WO00/06724 (43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04091 (22) 国際出願日 1999年7月29日(29.07.99) (30) 優先権データ 特願平10/218216 1998年7月31日(31.07.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒104-8238 東京都中央区新富二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 堀江秀典(HORIE, Hideon) [JP/JP] 〒216-0032 神奈川県横浜市中区六浦町942-16 Kanagawa, (JP) 稲垣好良(INAGAKI, Yoshimasa) [JP/JP] 〒370-1202 群馬県高崎市高砂町11-A203 Gunma, (JP) 相馬良明(SOMA, Yoshiaki) [JP/JP] 〒370-0843 群馬県高崎市高砂町26-2 Gunma, (JP) 門庭利彦(KADOYA, Toshihiko) [JP/JP] 〒370-0864 群馬県高崎市高砂町3304-10 Gunma, (JP)	(74) 代理人 弁理士 平水祐輔 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5ビル5階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, IT, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(54) Title: REMEDIES FOR NEUROPATHY CONTAINING AS THE ACTIVE INGREDIENT GALECTIN-1 OR ITS DERIVATIVES (55) 発明の名称 ガレクチン-1又はその誘導体を有効成分として含む神経障害用治療剤 (57) Abstract Remedies for neuropathy involving nerve injury, nerve degeneration and hypofunction at nerve grafting, which contain as the active ingredient galectin-1 having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or its derivatives, proteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or one having a homology of 90 % or above on the amino acid level with the above sequence and carrying disulfide bond(s) at least between Cys at the 16-position (Cys16) and Cys at the 88-position (Cys88) among cysteine residues at the 2-position (Cys2), 16-position (Cys16), 42-position (Cys42), 60-position (Cys60), 88-position (Cys88) and 130-position (Cys130); and a process for producing a protein by using an affinity column having an antibody against the above protein bonded thereto.	

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

この発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するガレクチン-1又はその誘導体を有効成分として含む、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下を含む神経障害の治療剤、配列番号1に示されるアミノ酸配列又はその配列とアミノ酸レベルで90%以上の相溶性のアミノ酸配列を有し、且つ、その配列中の2番目(Cys2)、16番目(Cys16)、42番目(Cys42)、60番目(Cys60)、88番目(Cys88)及び130番目(Cys130)のシステイン残基のうち少なくとも16番目のシステイン(Cys16)と88番目のシステイン(Cys88)の間でジスルフィド結合を形成している蛋白質、この蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティカラムを利用する蛋白質の製造方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロバキア
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GG	グアドループ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GD	グレンダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BB	バハマ	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャド
BF	ベナン	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	CM	カメルーン	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	US	米国
CH	スイス	IL	イスラエル	MN	モンゴル	UY	ウルグワイ
CN	中国	IN	インド	MR	モーリタニア	VN	ベトナム
CU	キューバ	IS	アイスランド	MW	マラウイ	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	JP	日本	NO	ノルウェー		
DE	ドイツ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

ガレクチン-1又はその誘導体を有効成分として含む

神経障害用治療剤

発明の技術分野

本発明は、神経突起の再生、神経組織の修復等の神経再生促進作用を有するガレクチン-1又はその誘導体、そのような蛋白質を有効成分とする神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下を含む神経障害の治療剤に関する。

発明の背景

交通事故等による神経損傷やガンやエイズ等の治療による神経損傷や神経障害、筋萎縮性側索硬化症、糖尿病性神経障害、老年痴呆、アルツハイマー症、パーキンソン病等の末梢神経及び中枢神経系の神経損傷や機能障害については、難治性で、重篤な症状を示す場合が多く、患者を死に至らしめることも少なくないが、現在、効果的な治療薬はない。これらの神経障害では、神経組織の変性、脱落、神経軸索の切断、退化等が起こることから、予防・治療に対しては、神経組織の変性や細胞死を抑制し、神経突起の再生を促進する作用を有する因子が有効な治療薬として期待されている。

約40年前にレヴィ・モンタルテニーニらによって神経成長因子(NGF)が発見されて以来、神経細胞に作用する液性の因子として、毛様体神経栄養因子(CNTF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、ニューロトロフィン-4/5(NT-4/5)、グリア由来神経栄養因子(GDNF)等の神経栄養因子類やサイトカイン等の中に種々の神経の生存維持や突起の再生に作用する因子があることが分かってきた。このうちの数種については医薬への適用に向けた研究もなされてきている。

ガレクチンはラクトサミン糖鎖に特異的な動物レクチンの総称であり、βガラクトシド結合動物レクチン、Sタイプレクチンとも呼ばれる。原虫、海綿等の下等な無脊椎動物からトリ、ヒトに至るまでの動物組織の細胞内にその存在が確認されている。このタイプのレクチンは数種見つかかり、1994年にそれらをガレクチンと総称することが提案された(S.H.Barondes et al., Cell, 76, 597-598, 1994)。現在までにガレクチンファミリーとしてガレクチン-1からガレクチン-11までが報告されている。これらのガレクチンの作用については、細胞増殖、細胞接着に関係している等の報告があるが、その生理的機能についてはまだよく分かっていない(J.Hirabayashi et al., J.Biochem., 119, 1-8, 1996; N.L.Perillo et al., J.Mol.Med., 76, 402-412, 1998)。また、ガレクチン-1に関しては多くの動物種由来フォームの構造も決定されている(ヒトガレクチン-1: J.Hirabayashi et al., J.Biochem., 104, 1-4, 1988; J.Hirabayashi et al., Biochim. Biophys. Acta., 1008, 85-91, 1989。ラットガレクチン-1: L.B.Clerch et al., Biochemistry, 27, 692-699, 1988。マウスガレクチン-1: T.J.G.Wilson et al., Biochem.J., 261, 847-852, 1989。ウシガレクチン-1: W.M.Abbot et al., Biochem.J., 259, 283-290, 1989)。特開平第2-84192号公報(発明の名称: 哺乳動物の14-β-galレクチン類、出願人: アイデオンコーポレーション)や国際公開第WO 94/11497号(Title: METHOD OF CAUSING SELECTIVE IMMUNOSUPPRESSION USING HL-60-RELATED LECTINS, Applicant: INCYTE PHARMACEUTICALS INC.)には、ガレクチン-1の遺伝子、蛋白、自己免疫疾患治療薬について記載されているが、神経損傷や神経障害等の神経変性疾患の治療薬に関する記載は全くない。

一方、ガレクチン-1の神経系に関する報告には次に示すものがある。感覚神経の発生期において脊髄後根神経節神経細胞にガレクチン-1が発現しているという報告(J.Dodd, et al., J. Exp. Biol., 124, 225-238, 1986; M.A. Hynes, et al., J. Neurosci., 10, 1004-1013, 1990)。脊髄後根神経節神経細胞において、ガレクチン-1は細胞接着基質として神経

細胞の凝集や神経突起進展に関与しているという報告 (R.L. Outenreath et al., J. Neurocytol., 21, 788-795, 1992)、発生期のラット嗅覚神経系細胞にはガレクチン-1が発現しており、細胞接着基質として神経突起進展に関与しているという報告 (N.K. Mahanthappa, et al., Development, 120, 1373-1384, 1994; E.H. Raabe, et al., Brain Res Dev Brain Res, 101, 187-196, 1997)、マウス嗅覚神経株細胞を用いた培養系において細胞接着基質として神経突起進展に関与しているという報告 (A.C. Puch, et al., Dev Biol., 179, 274-287, 1996)、数種の神経組織におけるガレクチン-1の分布に関する報告 (R. Joubert et al., Dev. Neurosci., 11, 397-413, 1989; S. Kuchler et al., Dev. Neurosci., 11, 414-427, 1989)などである。これらの報告はいずれも神経組織での分布や神経細胞の接着基質としての働きに関する記述にとどまっており、神経栄養因子や神経系に作用するサイトカイン類のような神経細胞あるいは傍神経系細胞への作用による神経再生促進因子としての記述はない。また、ヒトガレクチン-1は分子内に6個のシステイン残基を有するが、 β -ガラクトシド結合能はこの蛋白質が還元状態、即ちシステインがフリーの状態を有し、システインが酸化された状態、即ちSS結合が形成された状態では β -ガラクトシド結合能を持たないことが分かっている。先に記述した特許出願公開や神経系に関する報告は全て還元状態におけるガレクチン-1が有するレクチンとしての存在や作用について記述したものである。しかし、この蛋白質が酸化した状態、即ちSS結合が形成され、レクチン活性が認められない状態での神経再生促進因子や生存維持因子としての神経系への生理作用についてはひとつの報告も存在しない。

また、還元状態にあるガレクチン-1と酸化状態にあるガレクチン-1では上記の生物学的性質に加え、物理化学的性質も大きく異なる。酸化によりSS結合が形成されるということは、2分子のシステイン残基から1分子のシステイン残基となることであるから、蛋白質の分子量は1組のSS結合あたり水素原子2個分、即ち2ダルトン (Da) 小さくなる。ヒトガレクチン-1の場合は3組のSS結合が形成される可能性があり、

その場合は6 Da 小さくなることになる。その分子量の差は精度の高い質量分析計による分子重量測定により判別可能である。また、SS結合により蛋白質の高次構造が大きく変わり、分子としての立体的な大きさと分子表面に存在するアミノ酸残基が変化するためにSDS存在下の電気泳動の移動度や、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等における溶出時間も変化する。ガレクチン-1が還元状態にあるのか酸化状態にあるのかを判別するためには、これらの物理化学的性質を調べることにより可能である。

神経障害では、神経組織の変性、脱落、神経軸索の切断、退行等が起こることから、予防・治療に対しては、神経組織の変性や細胞死を抑制し、神経突起の再生を促進する作用を有する神経栄養因子類等が有効な治療薬として期待されている。NGF, CNTF, BDNF等の神経栄養因子類については医療への適用に向けた研究が進められている。これらの神経栄養因子類は、主に発生段階の幼若な動物から単離された神経細胞を用いて、その神経再生促進作用や神経細胞の生存維持機能を有する因子として見つけれられてきた。したがって、因子の作用発現のためには神経細胞に直接作用させる必要がある。しかし、成熟動物の神経細胞と発生段階の幼若な動物の神経細胞とは因子に対する反応性も異なることがあるとともに、生体内で神経細胞は培養皿の中のように単独では存在しておらず、神経細胞は通常、神経細胞同士、神経細胞とシユワン細胞等の傍神経系細胞に囲まれた状態で存在、接触してお互いに情報交換して機能を維持している。神経損傷後の神経再生に際しても神経細胞を取り巻く他の細胞との間のクロストークを行って機能修復がはかられている。このために、神経細胞に直接作用する因子類を神経細胞にいかに作用させるか、即ち投与方法の問題があり、神経障害治療薬としての開発が継続している。

このような状況の中で、本発明者らは、生体中で機能している構造をそのまま維持した神経組織の器官培養系を用いて、神経組織の神経線維切断端からの神経突起再生の促進及び生存維持活性を示す蛋白質因子

を見出すことによる別の角度からの新たな因子の発見、あるいは、物質としては既に知られている因子についての神経障害や損傷の治療薬としての新たな用途を見出すべく鋭意検討を行ってきた。

即ち、本発明の主たる目的は、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下を含む神経障害の治療に有効なガレクチン-1又はその誘導体、並びに、それらを有効成分とする神経障害の治療剤を提供することである。

発明の概要

本発明者らは、神経組織の神経線維の切断端からの神経突起再生を促進し、生存を維持する因子を得べく、種々の検討を行った。インビボにより近い評価方法として、成熟または老化ラットの後根神経節神経組織 (DRG) をコラーゲンゲル中に包埋し、その神経線維の切断端からの突起再生をみる器官培養アッセイ系を用いて因子の探索を行った。その結果、ラット肝由来 cDNA を動物発現用ベクターを用いてトランスフェクトした COS1 細胞培養上清から脊髄後根神経節線維の切断端からの突起再生を促進し、生存を維持する活性因子を精製し、部分配列を決定し、ガレクチン-1 配列を有する蛋白質と同定した。また、該ガレクチン-1 をコードする DNA から発現した蛋白質がインビトロ、インビボで神経突起の再生を促進し、生存維持活性を示すことを見出した。

即ち、本発明は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するガレクチン-1 又はその誘導体を有効成分として含む、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下を含む神経障害の治療剤を提供する。

本発明で使用されるガレクチン-1 又はその誘導体は、レクチン活性をもつものであってもよいし、或いは、レクチン活性をほとんど又は全くもたないものであってもよい。ここでレクチン活性とは β -ガラクトシド結合活性を指し、そのような活性をもつレクチンは通常ラクトースカラム結合能又は赤血球凝集能を有している。

本発明の実施態様において、ガレクチン-1 又はその誘導体は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中の 2 番目 (Cys2)、16 番目 (Cys16)、

42 番目 (Cys42)、60 番目 (Cys60)、88 番目 (Cys88) 及び 130 番目 (Cys130) のシステイン残基のうち少なくとも 16 番目のシステイン (Cys16) と 88 番目のシステイン (Cys88) の間でジスルフィド結合を形成している。

本明細書中「酸化型」とは、蛋白質の 2 つ以上のシステイン残基がジスルフィド結合を形成した、いわゆる酸化状態にあることを意味する。

本発明の蛋白質は、神経突起の再生、神経組織の修復等の神経再生促進作用をもつ。この意味では、本発明の蛋白質は神経栄養因子様の機能をもつといえる。従来公知のガレクチン-1 は還元型でレクチン活性をもち神経細胞の接着基質として作用することが知られていた (N.K. Mahanthappa ら, 上掲; A.C. Puch ら, 上掲; など) が、本発明のようにガレクチン-1 が神経再生促進因子として機能することは全く知られていなかった。

本発明の実施態様において、ガレクチン-1 又はその誘導体は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中以下の各システイン間にジスルフィド結合を形成しているものが例示される:

Cys16-Cys88, Cys2-Cys130 及び Cys42-Cys60; 又は
Cys16-Cys88, Cys2-Cys60 及び Cys42-Cys130; 又は
Cys16-Cys88, Cys2-Cys42 及び Cys60-Cys130;

或いは、(1)、(2) 及び (3) のうち少なくとも 2 つの組の混合物、特に (1) が 50% 以上含有する混合物。

誘導体としては、例えば以下のものが挙げられる:

(a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 個以上、好ましくは 1 個若しくは数個、のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ、神経再生促進作用を有するもの、或いは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を実質的に有するもの、ここで「実質的」とは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列においてその蛋白質の神経再生促進活性に影響を与えない少なくとも 1 個のアミノ酸の変更 (置換、欠失、挿入及び/又は付加) を含みうることを意味する。

(b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と比較してアミノ酸レベルで

80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するもの。

(c) N末端がアシル化（例えば、ホルミル化、アセチル化など）されているもの。

(d) N末端にMet¹Lys²又はMet¹が付加されているもの。

(e) 水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコールなど）又は炭水化物類と共有結合されているもの。

本発明の治療剤は、事故による外傷や外科手術等による中枢及び末梢の神経損傷時の神経再生促進、機能回復；ガンやエイズ等の疾病に対する化学療法や放射線療法等の治療的措置による神経の損傷によってもたらされた障害；薬剤や重金属、アルコール等の化学物質による中枢及び末梢の神経損傷による神経障害；虚血や感染、悪性腫瘍や代謝異常、例えば糖尿病性神経障害や腎臓や肝臓等の機能異常等による神経損傷；特定の神経系細胞の変性、例えば、運動神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病等の神経変性疾患；などの神経障害の治療に有用である。また、本発明の治療剤は、神経移植による機能低下等の神経障害の回復治療の際に神経再生促進剤として用いることもできる。

本発明の治療剤は、医薬的に許容される液体又は固体の担体と組合わせて、経口、非経口等の医薬形態とし得る。また、この治療剤には、本発明の蛋白質に加えて、NGF（神経成長因子）、BDNF（脳由来神経成長因子）等の他の1つ以上の神経栄養活性を有する因子、或はこのような因子を含む細胞外マトリックスまたは傍神経細胞が含有されてもよい。

本発明の実施態様において、本発明の治療剤は、本発明の蛋白質をコーラーゲンゲル中に含有させ、必要に応じて他の神経栄養因子を添加し、神経障害局所に直接埋め込む形態のものであってもよい。この場合、薬剤、担体等の必要な成分を生体適合性材料（例えば、シリコンゴム、コーラーゲン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアミドなど）からなるチューブ内に封入される。

あるいは、本発明は、本発明の上記治療剤を、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下等の神経障害に対する治療を必要とする患者（ヒトを含む）に投与することを含む該神経障害を治療する方法にも関する。

本発明はまた、上記定義のガレクチン-1又はその誘導体を提供する。

本発明はさらに、上記定義のガレクチン-1又はその誘導体を含有する物質（例えば、天然或いは組換え法又は化学的方法から得られた物質）を、上記蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティークラムに通して上記蛋白質を吸着し、次いでそれらを溶出し、必要に応じてさらに酸化処理にかけられることを含む、上記蛋白質を製造する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、ラットの各組織からのRNAに関するノーザンブロットアッセイの結果を示す電気泳動の写真である。

図2は、pRLF 転入 COS1 細胞の培養上清から精製された神経再生促進因子の電気泳動像を示す写真である。

図3は、pRLF 転入 COS1 細胞の培養上清から精製された神経再生促進因子をリシルエンドペプチダーゼで消化後、逆相カラムクロマトグラフィにより決定されたペプチドマップを示す。

図4は、大腸菌発現 Gal1 (1-134) の神経再生促進活性の結果を示す。ここで、中枢端および末梢端はそれぞれ中枢神経切断端、末梢神経切断端を示す。

図5は、大腸菌発現産物 Gal1 (1-134) をトリプシンで消化後、逆相カラムクロマトグラフィにより決定されたペプチドマップを示す。

図6は、大腸菌発現産物 Gal1 (1-134) のトリプシン消化後のフラグメントTP9のリシルエンドペプチダーゼによる2次消化産物の逆相カラムクロマトグラフィにより決定されたペプチドマップを示す。

図7は、大腸菌発現 Gal1 (1-134) の赤血球凝集活性測定の結果を示す。

図8は、Gal1(1-134) (A) とコントロール (B) を連続投与14日

間の後の坐減端から6mm末梢の部位の電子顕微鏡観察像を示す生物形態の写真である。

図9は、Gall(1-134)(A)とコントロール(B)投与の術後10日目灌流固定後、longitudinal凍結切片のH-E染色像を示す生物形態の写真である。

図10は、Gall(1-134)(A)とコントロール(B)投与の術後10日目灌流固定後、longitudinal凍結切片の抗NF抗体による免疫染色像を示す生物形態の写真である。

発明の詳細な説明

以下に、本発明の神経再生促進活性を有する蛋白質(以下、「本発明の蛋白質」と言う)の製造方法および該蛋白質を含む医薬組成物について説明する。

遺伝子構築

本発明の蛋白質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードするDNA、或いは、該アミノ酸配列の誘導体(例えば1個以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたアミノ酸配列)をコードするDNAを含む組換えベクターを構築し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた宿主細胞を培養し、目的の蛋白質を分離・精製して得ることができる。

本発明の蛋白質をコードするDNAは、ゲノムDNAの制限酵素切断、cDNAライブラリーからのクローニング、またはDNA合成により、またはこれにより得られたDNAをオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法やカセット変異法等の部位特異的突然変異技術やPCR法を用いて改変、増幅することにより、得ることができる。この場合、例えば、Molecular Cloning[Sambrookら,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]に記載の技術を使用することができる。

本発明の蛋白質の遺伝子及びその構造については、ヒト、マウスを含

む種々の生物のものについて既に知られている(例えば、Abbott et al., Biochem. J., 259, 291-294, 1989やChiariotti et al., Biochim. Biophys. Acta, 1089, 54-60, 1991)ので、これら公知の塩基配列やアミノ酸配列情報に基づき、cDNAライブラリーからPCR法やDNA合成技術等を用いて本発明の蛋白質をコードするDNAを適宜取得/作製することができる。

cDNAライブラリーから取得する方法については、例えば後述の実施例に示されるように、ヒト肝臓組織から慣用の手法によりcDNAライブラリーを作製し、既に知られているヒトガレクチン-1の塩基配列に基づき作製したプライマーを用いたPCR法により、本発明の蛋白質をコードするcDNAを取得することができる。

DNA化学合成により取得する場合には、例えばアルトンらの方法(特表昭59-501097号公報)によって、本発明の蛋白質のアミノ酸配列に基づき、必要であれば塩基コドンの使用も考慮して、塩基配列をデザインし、本発明の蛋白質をコードするDNA断片を得ることができる。

また、配列番号1に示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入及び/又は置換されたアミノ酸配列を有するオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法やカセット変異法等の部位にオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法やカセット変異法等の部位特異的突然変異技術(例えば、Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984, Inouye et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3438-3441, 1982, PCT W085/00817, 1985年2月28日公開, Wharton et al., Nature, 316, 601-605, 1985)やPCR法を用いて、またDNAの化学合成により、そのような変異体オリゴヌクレオチドをコードするDNAを作製することができる。

宿主細胞としては、原核生物(例えば細菌、好ましくは大腸菌)、真核生物(例えば酵母、昆虫、又は哺乳動物)細胞を用いることができる。哺乳動物細胞の例としては、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(Chinese Hamster Ovary)細胞、X63.6.5.3.細胞、C-127細胞、

BHK (Baby Hamster Kidney) 細胞、ヒト由来細胞 (例えば、HeLa 細胞) 等があげられる。酵母の例としては、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やメタノール質化性酵母 (*Pichia pastoris*) 等があげられる。昆虫細胞の例としては、蚕培養細胞 (例えば、Sf21 細胞) 等があげられる。

原核又は真核細胞を用いて本発明の蛋白質を製造する場合には、核蛋白質をコードする DNA に、制限酵素による切断部位の付与、および/または、発現を容易にするようなプロモーター等の DNA を付加したものを、適切な発現ベクターに組み込み、該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養し、産生された本発明の蛋白質を分離・精製することによって得ることができる。宿主として大腸菌を選択する場合には、大腸菌における発現に好ましいコドン (優先コドン) を組み込んでもよい。

大腸菌を形質転換するために用いられるベクターには、pKC30 (Shimatake H. and M. Rosenberg, Nature, 292, p128-132, 1981)、pTrec9A (Amann E. et al, Gene, 108, 193-200, 1991)、pCFM536 (ATCC No. 39934, 特表昭 60-501988 号参照) 等が挙げられる。

哺乳動物細胞用のベクターとしては、pSV2-neo (Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982)、pCAGGS (Niwa et al., Gene, 108, 193-200, 1991)、又は pcDL-SR α 296 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol., 8, 466-472, 1988) 等がある。酵母用としては pG-1 (Schena M. and Yamamoto K. R., Science, 241, 965-967, 1988) 等がある。蚕細胞用としては、組み換えウイルス作製用トランスファベクター-pAc373 (Luckow et al., Bio/Technology, 6, 47-55, 1988) 等がある。

これらのベクターは必要に応じて複製起点、選択マーカー、プロモーター、リボソーム結合部位を含んでもよく、真核細胞用のベクターにはさらに、必要に応じて RNA スプライス部位、ポリアダニル化シグナル等が付加される。

複製起点として、哺乳動物細胞用ベクターには、SV40、アデノウイルス

ス、ウシパピロマウイルス由来のもの等を用いることができる。大腸菌用ベクターとしては、ColEI、R 因子、F 因子由来のもの等を用いることができる。酵母用としては 2 μ DNA、ARS1 由来のもの等を用いることができる。

遺伝子発現用プロモーターとしては、哺乳動物細胞用ベクターには、ウイルス由来であるレトロウイルス、ポリオマウイルス、アデノウイルス、SV40 由来のもの等あるいは、染色体由来のもの (例えば、EF1- α) 等を用いることができる。大腸菌用ベクターには、バクテリオファージ由来のものや、*trp*、*lpp*、*lac*、*tac* プロモーター等を用いることができる。パン酵母用としては ADH、PH05、GPD、PGK、又は MAF α プロモーターを、また、メタノール質化性酵母については AOX1 プロモーター等を用いることができる。蚕細胞用ベクターには核多角体病ウイルス由来のもの等を用いることができる。

選択マーカーとして、哺乳動物細胞用ベクターには、ネオマイシン (neo) 耐性遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子等を用いることができる。大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を用いることができる。酵母用としては *Leu2*、*Trp1*、*Ura3* 遺伝子等を用いることができる。

例えば、配列番号 1 に示されたアミノ酸配列 1~134 位からなる本発明の蛋白質を製造する場合、1~134 位のアミノ酸配列をコードする DNA を合成し、その N 末端に NcoI サイト (翻訳開始コドンの ATG を含む) を付加し、また C 末端には stop コドンとその下流に BamHI サイトを付加する。この DNA 断片を、NcoI、BamHI で処理し、NcoI、BamHI で消化した pET-3d (ストラタジーン社製) にクローニングし、*Epicurian Coli* BL21(DE3) Competent Cells (ストラタジーン社製) を使用し、発現ベクターを有する大腸菌株を本発明の蛋白質発現用の形質転換体とする。発現ブラスミッド pET-3d 中で目的遺伝子は T7 プロモーター

ター下流に押入され、宿主大腸菌より供給される T7 RNA ポリメラーゼにより転写される。この T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は、宿主大腸菌染色体に組み込まれており、*lac UV5* プロモーター下流にあるため、IPTG 添加による誘導で発現をコントロールできる。

蛋白発現、リフォールディング、精製

以上の様な宿主-ベクター系を用いて本発明の蛋白質を得るためには、上記ベクターの適当な部位に該遺伝子を組み込んだ組み換え DNA 体により、宿主細胞を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養し、さらに細胞内あるいは培養液から該ポリペプチドを分離・精製すればよい。これらに用いられる手段・方法は公知のものを組み合わせて行うことができる。

宿主を用いて発現させる場合に、その発現産物の N 末端をより確実に均一化するため、本来のシグナル配列を改変したり、他の蛋白質のシグナル配列を用いてもよい。また、N 末端およびその近傍のアミノ酸残基を改変（置換、または付加）すること（例えば、大腸菌を用いて発現させる場合にメチオニン残基の他に、アルギニンまたはリジン残基を付加するなど）によっても、N 末端を均一化することが可能である。

また、本発明の蛋白質の N 末端あるいは C 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST: Glutathione-S-transferase)、ヒスチジンタグ、あるいは FLAG ペプチド等の特異的酵素（例えばトロンピン、Factor Xa、エンテロカイネースなど）の認識ペプチドを介して付加し、融合蛋白質として適当な宿主にて発現させ、単離した後、その融合蛋白質を該当する酵素により処理することにより、本発明の蛋白質を得ることができ。

本発明の蛋白質としては、配列番号 1 に示されたアミノ酸配列から成る蛋白質がある。また、本発明には、神経再生促進活性を保持する限り、その一部のアミノ酸配列が改変（置換、欠失、挿入および/または付加）されたもの、即ち本発明の蛋白質誘導体も含まれる。

本発明の蛋白質誘導体の例としては、例えば、アミノ酸の改変（置換、欠失、挿入および/または付加）、N 末端のアシル化、 α -アミノ基若しくは ϵ -アミノ基へのポリエチレングリコール等水溶性ポリマーの結合などによって安定性や体内での持続性の向上、免疫原性の低下を図ることができる。

一般に蛋白質の熱力学的安定性を向上させる方法として、プロリン残基の導入とグリシン残基の除去が有効であることが理論的に示されている (Matthews ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6663-6667, 1987)。そこで、安定性の向上を目的とした本発明の蛋白質誘導体を設計する場合、プロリン残基を導入した本発明の蛋白質誘導体およびグリシン残基を除去した本発明の蛋白質誘導体を考えることができる。

また、一般に蛋白質は、疎水性アミノ酸を内側に、親水性アミノ酸を外側に立体構造が形成されることから、蛋白質表面に存在するアミノ酸をより親水性の高い荷電性アミノ酸に置換することによって蛋白質の溶解性の向上を期待することができる。本発明の蛋白質の場合でも、このような観点から誘導体を設計することができる。

さらに、相同性を有する他の生物種由来のグレクチン-1 (ニワトリグレクチン: Ohyama, Y. ら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 巻, 51-56 頁, (1986)、ラットグレクチン: Clerch, L. B. ら, *Biochemistry* 27 巻, 692-699 頁, (1988)、マウスグレクチン: Wilson, T. J. G. ら, *Biochem. J.* 261 巻, 847-852 頁, (1989)、ウシグレクチン: Abbot, W. M. ら, *Biochem. J.* 259 巻, 283-290 頁, (1989)、等) のアミノ酸配列を利用することができ。例えば、ヒト型とラット型のアミノ酸配列を比較し、ヒト型ではプロリンではないがラット型ではプロリンを有する部位、あるいは、ヒト型ではグリシンだがラット型ではグリシン以外のアミノ酸を有する部位を選ぶことができる。

また、本発明の蛋白質としては、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するヒト型の本発明の蛋白質、および前述の誘導体の 2 位にメチオニン残基、かつ 1 位にリジン残基が付加された蛋白質、1 位に

メチオニン残基が付加された蛋白質も含まれる。宿主として細菌（例えば、大腸菌）を用いて菌体内発現を行う場合には、神経再生促進活性を有する蛋白質のN末端側に開始メチオニン残基の付加された蛋白質が得られる場合もあることが知られている。また、用いる宿主によっては、産生される神経再生促進活性を有する蛋白質はグリコシル化されている場合やN末端がアセチル基、ホルミル基等によりプロテックされている場合もあるし、あるいはされていない場合もあるがいずれも、本発明の蛋白質に含まれる。

本発明の蛋白質は、天然の供給源（例えば、神経再生促進活性を含むならし培地、またはヒト肺、腎臓、胎盤等）から精製および単離されたものでもよいが、好ましくは遺伝子組換え法によって得られたものである。後者の場合、大量生産が可能であるという利点がある。

天然源や組換え細胞から本発明の蛋白質を精製する場合、一般に蛋白質の精製に用いられる手法、例えば塩析、硫酸分画、溶媒抽出、HPLC、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、色素吸着クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル透過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、硫酸化ゲルクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、金属キレートインゲンククロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、分取電気泳動法、および等電点電気泳動法など、のいずれを組み合わせて行うことができる。また、後述の実施例から推定しうる本発明の蛋白質の物理化学的な性質を利用することもできる。さらには、本発明の蛋白質を認識することのできる抗体を用いた抗体カラムを用いることもできる。

本発明の蛋白質のアミノ酸配列中には6個のシステイン残基が含まれるが、その存在様式はジスルフィド結合で架橋されていること（酸化されていること）が望ましい。還元型蛋白質を酸化型蛋白質に変換する酸化方法としては化学的酸化法あるいはジスルフィド交換反応を利用する

ことができる。化学的酸化法としては空気酸化法、重金属イオン（例えば Cu^{2+} ）を触媒として用いる空気酸化法、ヨードソ安息香酸や過酸化水素を用いる方法等を利用できる。また、ジスルフィド交換反応としては還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンを含む酸化還元緩衝液を用いる方法が代表的であるが、システインやジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、システアミンをベースにした酸化還元緩衝液を用いる方法も利用できる。これによって、配列番号1に示されるアミノ酸配列中の2番目(Cys2)、16番目(Cys16)、42番目(Cys42)、60番目(Cys60)、88番目(Cys88)及び130番目(Cys130)のシステイン残基のうち少なくとも16番目のシステイン(Cys16)と88番目のシステイン(Cys88)の間でジスルフィド結合を形成している本発明の蛋白質を得ることができる。蛋白質中、ジスルフィド結合は1個以上3個以下、好ましくは2～3個、さらに好ましくは3個である。配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするDNAを大腸菌で発現させリフォールディング操作を行った場合には、以下の各システイン間にジスルフィド結合を有する(1) Cys16-Cys88, Cys2-Cys130 及び Cys42-Cys60; (2) Cys16-Cys88, Cys2-Cys60 及び Cys42-Cys130; (3) Cys16-Cys88, Cys2-Cys42 及び Cys60-Cys130 の3種類の酸化型グレクチン-1からなり、(1)のグレクチン-1を50%以上含む混合物として得られる。また、該DNAをCOSI細胞で発現させた場合には、(1)の酸化型グレクチン-1が主として得られる。カラムとしてYMC Protein RP (内径10mm×長さ250mm, YMC社製)を用いて、室温にて0.1% TFA中でアセトニトリルの濃度を60分間で32%～40%までの直線的に上昇させる高速逆相クロマトグラフィーによって、大腸菌発現の酸化型グレクチン-1は、(1)のフォームが約36%アセトニトリル濃度、(2)、(3)のフォームが約34%アセトニトリル濃度で溶出される。COSI細胞発現の(1)のフォームは、カラムとしてYMC Protein RP (内径4.6mm×長さ150mm, YMC社製)を用いて、室温にて0.1% TFA中でアセトニトリルの濃度を45分間で32%から44%までの直線的

的に上昇させる高逆相クロマトグラフィーによって、約38%アセトニトリル濃度で溶出される。

医薬組成物

本発明には、上記定義のガレクチン-1又はその誘導体を有効成分として含む、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下、等の神経障害の治療剤も包含される。

治療剤には、一般的な適当な液体または固体担体の他に、希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントが含まれてもよい (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, 1995 参照)。このような組成物は、液体または

固体からなる形態であって、種々の pH およびイオン強度から成る緩衝剤 (例えばトリス-塩酸、酢酸塩、リン酸塩) より選択した希釈剤、表面に吸着しないようにするためのアルブミンまたはゼラチンのような添加剤、界面活性剤 (例えば Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩)、可溶化剤 (例えばグリセロール、ポリエチレングリコール)、酸化防止剤 (例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤 (例えばチメロサル、ベンジルアルコール、パラベン)、賦形剤または等強化剤 (例えばラクトース、マンニトール) を配合し得る。

また、蛋白質に対するポリエチレングリコールのような水溶性ポリマーとの共有結合、金属イオンとの錯体化、あるいはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどのような重合化合物の粒状製剤中またはその表面上への、あるいはリポソーム、ミクロエマルジョン、ミセル、単層または多層小胞、赤血球ゴースト、またはスフェロプラスト中への該物質の取り込みを含む。このような組成物は、本発明の蛋白質の物理的状態、溶解性、安定性、インビボ放出速度、インビボクリアランスに影響を及ぼすと思われるので、組成物の選択は、神経再生促進活性を有する蛋白質の物理的および化学的特性による。

本発明の治療剤は、非経口、経肺、経鼻、経口、局部埋め込みを含め

た種々の投与経路が可能であり、投与経路に応じて粒状形態、保護被膜、プロテアーゼ阻害剤の配合、吸収促進剤の配合、コラーゲンなどの生体材料または生体適合材料への包接、等とすることができる。剤型としては、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、エアゾル剤、腸溶剤、徐放製剤、埋め込み型製剤などであるが、これらに制限されない。本発明の実施態様において、本発明の蛋白質をコラーゲンゲル中に含ませ神経障害局部に直接埋め込む形態のものであってもよいが、例えば、薬剤、担体等の必要な成分を生体適合性材料 (例えば、シリコンゴム、コラーゲン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアミドなど) からなるチューブ内に封入し得る。

本発明の蛋白質を含む治療剤は、活性成分として通常 0.01 μg/k 体重 ~ 1 mg/k 体重を、年齢、体重、病状、性別、投与経路等に応じて、一日 1 回 ~ 数回程度投与することができる。しかし、投与量はこの範囲に限定されず、治療上の種々の要因によって変動させ得る。

本発明の蛋白質は、単独あるいは他の付加的神経栄養活性を有する因子類と組み合わせても、多数の神経系障害の治療に有用である。他の付加的因子としては、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5、NT-6 等のニューロトロフィンファミリーやインスリン、IGF-I、IGF-II 等のインスリンファミリー、aFGF、bFGF、FGF-5 等の FGF ファミリー、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6 等のインターロイキン類や LIF、GM-CSF、G-CSF、EPO、TPQ、CNTF、オンコスタチン (oncostatin) M、TNFα、チオレドキシン、GDNF、TGFβ、EGF、成長促進活性 (growth promoting activity)、成長抑制因子 (growth inhibitory factor)、プラスミノーゲン (plasminogen)、グリア由来ネキシン (glia-derived nexin)、α₂ マクログロブリン (macroglobulin)、S100 蛋白質、アネキシン (annexin) V、神経特異的エノラーゼ (neuron specific enolase)、トロンボスポンジン (thrombospondin)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor) を挙げることができる。更に GNL、GM2 等のガングリオシドやアデノコル

チコトロピンホルモン (adrenocorticotrophic hormone (ATCH))、チロトロピン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone (TRH))、海馬コリン作動性神経栄養因子 (hippocampal cholinergic neurotrophic peptide (HCNP))、コルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone (CRF)) 等の神経バプチドを挙げる事ができる。望ましくは、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5、NT-6、IGF-I、IGF-II、CNTF、GDNFを挙げる事ができる。

また、本発明の蛋白質は、細胞外マトリックスや傍神経系細胞と組み合わせても神経系障害の治療に有用である。細胞外マトリックスとしては、ラミニン、フィブロンネクチン、スロンボスポンディン、コラーゲン等が挙げられる。傍神経系細胞としては、シュワン細胞、線維芽細胞、サテライト細胞、マクロファージ、グリア細胞等が挙げられる。また、傍神経系細胞の基底膜との組み合わせも神経障害治療に有用である。

本発明の蛋白質は、インビトロ及びインビボでの試験によって、神経の切断、坐減、凍結等による損傷からの神経突起の再生、再有髄化を促進することが示された。神経線維をともなった脊髄後根神経節をコラーゲンゲル中に包埋しその神経線維切断端からの神経突起再生効果を調べる系 (Horie H. et al., *Neurosci Lett* 121, 125-128 (1991), Horie H. et al., *NeuroReport* 2, 521-524 (1991)) によって、明らかな神経突起再生効果を示した。更にインビボにおいても、坐骨神経の切断や坐減、凍結による神経損傷からの神経再生効果を示した。先に報告されている方法 (S. Varon, et al., pp101-122 in "Frontiers of clinical neuroscience, vol. 6 「Neural Regeneration and Transplantation」" edited by F. J. Seil (Alan R. Liss, Inc.) (1989), G. Lundborg, et al., *Exp. Neurol.*, 76, 361-375 (1982), L. R. Williams, et al., *J. Comp. Neurol.*, 218, 460-470 (1983), Q. Zao, et al., *Restor. Neurol. Neurosci.*, 5, 197-204 (1993)) を参考にして、坐骨神経切断端へシリコンチューブを装着し、チューブ内への神経突起の再生を調べる実験を行った結果、本発明の蛋白質はコラーゲンゲルを充填

したチューブ内への神経突起再生を促進する効果を示した。また、坐骨神経を坐減及び凍結による損傷を与えた後の神経再生過程を損傷部の電子顕微鏡による観察実験 (A. Seto, Hasegawa M., Uchiyama N., Yamashita T., Yamashita J.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:1182-1190 (1997)) を行った結果、本発明の蛋白質の投与によって神経突起再生及び再有髄化が促進されることが明らかとなった。本発明のこれらの実験による神経再生促進効果から、本発明の蛋白質は神経突起の退縮や脱髄を伴う様々な神経損傷や神経変性疾患等の神経障害の治療に有用であると考えられる。

本発明の蛋白質の用途としては、事故による外傷や外科手術等による中枢及び末梢の神経損傷時の神経再生促進、機能回復に有用である。また、ガンやエイズ等の疾病に対する化学療法や放射線療法等の治療的措置による神経の損傷によってもたらされた障害の処置である。また、薬剤や重金属、アルコール等の化学物質による中枢及び末梢の神経損傷による神経障害に投与することができる。神経障害はまた、虚血や感染、悪性腫瘍や代謝異常、例えば糖尿病性神経障害や腎臓や肝臓等の機能異常等、による神経損傷によっても起こる。更に、神経障害は、特定の神経系細胞の変性、例えば、運動神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病等の神経変性疾患、によっても起こる。本発明の蛋白質は、上に示したような神経の損傷や変性による神経障害の処置に用いることができる。また、神経損傷時の末梢神経の移植時や人工神経移植時の患者に投与することができる。また、本発明の蛋白質の産生異常による神経機能障害にも有用である。

本発明はさらに、抗体カラムを用いて本発明の蛋白質を製造する方法を提供する。抗体カラムは、本発明の蛋白質と交差反応する抗体をカラムの支持体に結合することによって得られる。この場合、蛋白質全体または抗原決定基を有するその断片が抗原として使い得る。抗体は、モノクローナルおよびポリクローナル抗体の双方、および既知の方法によって作製したキメラ抗体、即ち“組換え”抗体などを含む。種々の抗原決

定基(エピトープ)に対する種々の抗体を一般に含有する慣用的抗体(ポリクローナル)であるのに対して、モノクローナル抗体は各々、抗原上の単一抗原決定基に対する抗体である。

ポリクローナル抗体については、本発明の蛋白質を Freund の完全アジュバントに乳濁させてウサギ、マウス、ラット、モルモット、ヒツジなどの動物に免疫し、さらに Freund の不完全アジュバントを用いて 2 週間おきにブーストし、放血により抗血清を得ることができる。必要に応じて、抗血清を例えば硫酸分画にかけて IgG を粗精製し、さらに、この粗精製物を、精製蛋白質を結合したアフィニティカラム(例えば、CNBr 活性化 Sepharose 使用)に通す吸収操作によって本発明蛋白質に対する特異抗体を得ることができる。

モノクローナル抗体の利点は、それらが、他の免疫グロブリンが混入していない培地中でハイブリドーマ細胞によって合成され得ることである。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞の培養上清から、またはマウスにハイブリドーマ細胞を腹腔内接種することによって誘導される腹水から調製される。Kohler と Milstein が最初に記載したハイブリドーマ技術(Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976))は、多数の特異抗原に対する高レベルのモノクローナル抗体を保有するハイブリッド細胞系を生成するために広く用い得る。モノクローナル抗体は次のようにして調製することができる。本発明の蛋白質を死菌体等のアジュバントと共にマウス(例えば、BALB/c)に腹腔内注射により免疫し、追加免疫の後、抗体の産生を確認してマウスから脾臓を摘出する。脾臓細胞を調製し、ポリエチレングリコール(例えば、#4000)の存在下に HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有)培地中、速やかにミエローマ細胞株(例えば、X63、NS-1 など)と融合する。ハイブリドーマの HAT 選択、特異抗体産生細胞のスクリーニングの後、この特異抗体産生細胞をマウスの腹腔に接種してクローン化し、モノクローナル抗体を得る。モノクローナル抗体の作製法の詳細については、例えば、岩崎辰夫ら共著、「単クローン抗体-ハイブリドーマと ELISA」(1987)講談社

サイエンティフィック、東京、日本国に記載されている。

上記のようにして得られた抗体は、臭化シアンで活性化した Sepharose (ファルマシア社製)などのアガロースゲル等のゲルに結合して抗体カラムを作製し、このカラムに天然源(例えば、神経再生促進活性を含むならし培地、またはヒト肺、腎臓、胎盤等)、組織細胞または培養物などに由来する液体を流して吸着させ、塩濃度勾配、pH 変化、変性剤を用いて溶出することによって、本発明の蛋白質を分離・精製することができる。

本発明の蛋白質含有治療剤を安定化するために、糖類、界面活性剤等の安定化剤を添加し得るが、例えば以下のものが挙げられる。

糖類としては、マンニトール、ラクトース、シュクロース、マルトース、グルコース、イノシトール、キシロース、ソルビトール、フルクトース、ガラクトース、リボース、マンノース、セロビオース、シクロデキストリンなどが利用できる。これらの中でもソルビトール、マンニトール、シュクロースが好ましい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリソルベート 80 やモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン(別名:ポリソルベート 20)などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタンなどのソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖モノラウリン酸エステルなどのショ糖脂肪酸エステル、塩化ベンゼントリウム、塩化ベンザルコニウムなどの芳香族四級アンモニウム塩、カプリル酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどが利用できる。この中でも、ポリソルベート 80 やポリソルベート 20、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油が好ましい。

本発明において用いられるこれらの糖類、界面活性剤は、本発明の蛋白質含有治療剤中、糖類の場合には 0.1 ~ 50% (w/v)、界面活性剤の場合には 0.0001 ~ 50% (w/v) の範囲で使用され得る。

本発明の蛋白質含有治療剤としては、上述の神経栄養活性性を有する

種々の蛋白質のみならず、該蛋白質が少なくとも一つの水溶性ポリマーに結合している化学修飾した本発明の蛋白質も含まれる。水溶性ポリマーは、例えば、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ(N-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレノキシド/エチレノキシドコポリマー、ポリビニルアルコールなどから選択される。これらのポリマーは、蛋白質のN末端の α -アミノ基やリジンの ϵ -アミノ基とアルデヒドのような反応性基を介して共有結合することができ、特に本発明の蛋白質は反応性ポリエチレングリコール(PEG)分子と反応して、PEGを本発明の蛋白質に付加させたものが好ましい。また、PEGの分子量は6 kDa~50 kDaのものが好ましい。

本発明の蛋白質は、上記および下記で説明するように、神経突起の再生及び神経組織の修復を促進し且つ生存維持を促進する、神経障害時の神経再生促進剤として有用である。

実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

以下の実施例において、末梢神経再生のインビトロ評価を次のようにして行った。

神経線維を伴った背髄後根神経節(DRG: Dorsal Root Ganglion)を動物より摘出し、コラーゲンゲル内で培養した系をインビトロモデルとして用いる。この系を用いた因子の神経再生促進、生存維持活性の測定は以前に発表した論文(H. Horie et al, NeuroReport, 8, 1955-1959, 1997)の記載に従って実施した。3ヶ月齢のWistar ラットより1~2 mmの長さの神経線維束を伴ったT2~T11のDRGを摘出した。このDRGを氷上(0℃)におかれた培養ディッシュ上のコラーゲン溶液(希酢酸溶液に溶解した0.5%コラーゲン(タイプI) 溶液(A)、10倍濃縮最小必須培地(MEM)(B)、2.2gNaHCO₃と4.77gHEPESを0.05NNaOHに溶解し

100mlとした溶液(C)をA:B:C=8:1:1(容量)の割合で混合した溶液)中に置いた。このディッシュを37℃に直ちに加温し5分間保温してコラーゲン溶液をゲル化させた。その後ディッシュに5 μ g/mlインジュリン、5 μ g/ml トランスフェリン、20nM プロゲステロン、30nM 亜セレン酸ナトリウム、0.1mM プトレジンを含むHam's F12培地を満たし、5%CO₂含有水蒸気飽和大気中37℃で培養した。

培地中に種々の濃度の神経再生促進因子や精製途中の分画分を加え、6~7日培養した後、神経線維切断端からの再生神経突起数を位相差顕微鏡下で測定した。各DRGについて末梢側と中枢側の神経線維切断端のそれぞれの再生神経突起数を測定し、測定した全DRGよりそれぞれの平均値並びに標準誤差値を算出し、活性の優位性を統計的に評価した。

実施例1

ラット初代培養肝細胞からのmRNAの精製

堀江らによってラット初代培養肝細胞の培養上清中に神経再生促進活性が見い出された(Horie H. et al., Neuroreport, 2, 521-524, 1991)ことから、ラット初代培養肝細胞をラット神経再生促進因子のcDNAクローニングの材料に選び以下の実験に供した。

全RNAの抽出はISOGEN [ニッポンジーン社製; AGPC法 (Chomczynski P, et al., Anal. Biochem. 162, 156-159, 1987) によるRNA抽出試薬]を用いて行った。ラット初代肝細胞の調製は、酢酸沈澱法(中村敏一著、初代培養肝細胞実験法、1987年、学会出版センター、東京、日本国)を用いて行い、培養はコラーゲンコートした培養フラスコ中でWilliam's E液に5 μ g/ml インスリン(シグマ社製)、0.01 μ g/ml EGF(東洋紡社製、日本国)、0.3 μ g/ml アブロチニン(シグマ社製)を加えた無血清培養液で行った。8週齢のラットの肝臓から調製した初代培養細胞を25枚の175cm²培養フラスコ(ファルコン社製)に一枚当たり8 $\times 10^6$ 個置き、5%炭酸ガス培養器中にて37℃で2日間培養した後、フラスコから培養液を除き、1枚当たり4mlのISOGEN溶液を加え、よく懸濁し

た後混合液を集めた。この全量 100ml の混合液は、22G の注射針を装填した 50ml 容の注射器を用い、粘性がほとんどなくなるまでおよそ 20 回吸入排出を繰り返した。混合液に 20ml のクロロホルムを加え、混合した後、12,000G で 15 分間遠心した。上清を注意深く他のチューブに移し、50ml のイソプロピルアルコールを加えて混合し、12,000G で 10 分間遠心した。得られたペレットは少量の 70%エタノールを用いて 1 回洗浄した。これにより、約 2×10^6 個の肝細胞より全 RNA 約 2mg を得た。全 RNA からのポリ(A)⁺ RNA の精製は mRNA Purification Kit (ファルマシア社製；オリゴ dT セルロースを用いた方法) を用いて行った。全 RNA 約 2mg より 90 μ g のポリ(A)⁺ RNA を得た。

実施例 2

発現クローニング用ラット初代培養肝細胞由来 cDNA ライブラリーの構築

実施例 1 で得られた 5 μ g のポリ(A)⁺ RNA から TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit [ファルマシア社製；Gubler & Hoffman 法 (Gene 25, 263-269, 1983) の変法による cDNA 合成法のキット] および DIRECTIONAL CLONING TOOLBOX [ファルマシア社製；NotI 配列を含む cDNA 合成のためのプライマー：5' - AACTGGAGCAATTGGCGCCGAGGAA(T)₁₀-3' (配列番号 11) 並びに EcoRI 配列付加用アダプター：5' -AATTCGGCAGGAGG-3' (配列番号 12) および 5' -CCTCGTGGCG-3' のセット] を用いて、Met 側に EcoRI、ポリ(A)側に NotI 認識部位を持つ 2 本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA の 2/3 は 1.5 μ g の予め EcoRI および NotI で消化した発現ベクター pEF18S (Ohashi H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 158-162, 1994) と連結させ、12 等分した後、それぞれ 1000 μ l のコンピデント・ハイ E. coli DH5 (東洋紡績社製、日本国) を形質転換した。その結果、それぞれ 8.3×10^4 個の形質転換体を持つ 12 個の cDNA ライブラリーのプールが作製された (全ライブラリーとしては、 1.0×10^6 個)。

実施例 3

発現クローニングによる pRLf cDNA の取導

実施例 2 で作製したラット初代培養肝細胞 cDNA ライブラリーの各プールを 50 μ g/ml の Ampicillin を含む 15ml の 2 \times LB 培地 (2% Tryptone, 1% yeast extract, 1% NaCl, 0.2% Glucose) 中で一夜培養した後、その 0.5ml の培養液に加圧滅菌した 0.5ml のグリセリンを加えて混和し、-80°C で保存した。この保存菌 200 μ l を 50 μ g/ml の Ampicillin を含む 50ml の LB 培地 (1% Tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% Glucose) 中で一夜培養した後、本質的に Molecular Cloning [Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されているようにしてプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA 全量 200 μ g のうち 50 μ g は、クロロキン処理を含む DEAE-デキストラン法 (Sompayrac LM, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7575-7578, 1981; Luthman H, et al., Nucl. Acids Res., 11, 1295-1308, 1983) に若干の変更を加えた以下の方法に従い、COS1 細胞ヘトランスフェクションした。10%ウシ胎仔血清 (FCS) を含む Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に浮遊させた COS1 細胞 (ATCC CRL1650) 1.5×10^6 個をセルマトリックス (岩城硝子社製、日本国) にてコーティングした培養表面積 225cm² の組織培養用プラスチックフラスコ (コーニング社製) に焼き、5% 炭酸ガス培養器中にて 37°C で一夜培養した。一方、250mg/ml の DEAE-デキストラン (ファルマシア社製)、48mM のクロロキン (シグマ社製)、及び 8% (v/v) の Nu-Serum (コラポレイティブ社製) を含む 25ml の IMDM に 250 μ l の HBS (21mM HEPES - 145mM NaCl, pH 7.1) に溶解した各プールのプラスミド DNA を混和し、トランスフェクション直前に IMDM で 2 度洗浄した上記の COS1 細胞に添加した後、5% 炭酸ガス培養器中にて 37°C で 3 時間培養した。その後、培養上清を吸引除去し IMDM でフラスコを 2 度洗浄した後、0.02% のウシ血清アルブミン、20 μ g/ml のヒトインスリン (ギブコ社製)、20 μ g/ml のヒトトランスフ

エリン（ギブコ社製）、 $40\mu\text{M}$ のモノエタノールアミン（シグマ社製）、 $0.1\mu\text{M}$ の亜セレン酸ナトリウム（シグマ社製）を含む IMDM を 65ml 加え、 5% 炭酸ガス培養器中にて 37°C で 3 日間培養し、培養上清を回収した。得られた培養上清を F12 培地に対して十分に透析後、上述した *in vitro* アッセイ系で神経再生促進活性を測定した。その結果、一つのブールのプラスミドをトランスフェクションして発現させた COS1 細胞の培養上清中に神経再生促進活性が認められた。

次に、活性が認められたブールの保存菌液を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の Ampicillin を含む CIRCLEGROW™ (B10 101 社製) 培地で 10^5 倍に希釈し、 18 本のチューブに 2.5ml ずつ分注して一夜培養した[希釈液 $50\mu\text{l}$ を Ampicillin を含む LB 寒天培地 (LB 培地に 1.5% agar を添加) 上に蒔き、 37°C で一夜培養して出現するコロニーの数を数えることにより、 1 本のチューブには 8.2×10^3 種類の cDNA クロネンが含まれることを確認した。すなわち、 8.2×10^3 個のブールが作成された。]。この培養液 0.5ml に加圧滅菌したグリセロール 0.5ml を加えて -80°C に保存し、残りの 2ml から前述と同様にプラスミド DNA を精製し、各ブールにつき $5\mu\text{g}$ を得た。さらにこのプラスミドを前述の方法で COS1 細胞へトランスフェクションし（これ以降は、直径 60mm のシャーレを用い、スケールダウンして行った）、その培養上清中の神経再生促進活性を測定した。これにより、活性を有するブールを一つ得た。このようなスクリーニングを繰り返すことによって、活性を有するブールの cDNA クロネン数を 8.3×10^4 個、 8.2×10^3 個、 1.5×10^3 個、 220 個と順次減らして行った。なお、活性を有するブールが 1 ラウンドのスクリーニングで複数得られたときは、その内の 1 ブールを次のラウンドのスクリーニングに用いた。ブールのクロネン数が 220 個になったところで、ブールの保存菌液を希釈して Ampicillin を含む LB 寒天培地上に接種し、一夜培養後コロニーを形成させ、 540 個の独立コロニーをピッキングアップした。ピッキングアップしたコロニー 20 個を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の Ampicillin を含む 2.5ml の CIRCLEGROW™ (B10 101 社製) 培地に接種してひとまとめとしたブールを 27 個作った。ブールの一夜

培養液 2ml から前述と同様にプラスミド DNA を精製し、さらに COS1 細胞へトランスフェクションし、その培養上清中の神経再生促進活性を測定した。これにより、活性を有するブールを一つ得た。活性を有するブールを構成する 20 個のコロニーについて、それぞれ別個に前述のとおりプラスミドを精製し、さらに COS1 細胞へトランスフェクションし、その培養上清中の神経再生促進活性を測定した。これにより、活性を有する cDNA クロネンを一つ得た。このクロネンを pRLF と命名した。

実施例 4

ラット pRLFcDNA のシークエンス構造解析

実施例 3 で得られた cDNA クロネン pRLF のプラスミド DNA の精製は本質的に Molecular Cloning [Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されているようにして実施した。クロネン pRLF を接種した $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の Ampicillin を含む 40ml の CIRCLEGROW™ 培地一夜培養液から約 $700\mu\text{g}$ のプラスミド DNA を得た。得られたプラスミド DNA は、ユニバーサルプライマー及び明らかにあった cDNA の配列をもとに合成[合成にはパーキンエルマー社製 394 DNA/RNA シンセサイザー (β -シアノエチルアミダイト法にもとづく合成機)を使用し、精製は同社製の合成 DNA 精製用 OPCR カラム (逆相シリカゲルを充填したカラムでトリチル基を持つ合成 DNA を精製するカラム)を用いて行った。精製した合成 DNA は TE 溶液に $20\mu\text{M}$ となるように溶解し、使用時まで -20°C に保存した]した 20 塩基前後のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、Taq Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー社製; PCR を利用した、蛍光色素で行なうジデオキシ法; Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, 1977)を用い、アブライドバイオシステムズ社製 373ADNA シークエンサー (蛍光シークエンサー)により cDNA 全長の塩基配列を決定した。塩基配列を配列表 (配列番号 2) に示した。

実施例 5**ラット各種組織での pRLF mRNA の検出**

pRLF が完全長であるか否か、また mRNA の産生臓器を確認するため、Rat Multiple Tissue Northern Blot [CLONTECH 社製：ラットの各組織の poly(A)⁺RNA をプロットしたナイロンメンブレン] を用いてノザンブロットティングを行なった。ノザンブロットティングは本質的に Molecular Cloning [Sambrook 等、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されているようにして実施した。プレハイブリダイゼーションは 50%ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt's solution、1% SDS、200 μg/ml サケ精子 DNA を含む 20 ml の溶液中で 42℃ 1 時間行なう。プローブは、pRLF を制限酵素 NotI と EcoRI で消化した後、0.8% アガロースゲル (FMC BioProducts 社製) を用いた電気泳動にかけ、約 600bp の cDNA 断片を分離し、ブレップ-A-2 ジーン DNA 精製キット (パイオラッド社製) を用いて精製し、Random Primer DNA labelling kit (宝酒造社製、日本国；Anal. Biochem., 132, 6-13, 1983 に記載のランダムプライマー法を利用した DNA 標識キット) を用いて ³²P 標識したものを用いる。ハイブリダイゼーションはプレハイブリダイゼーションと同じ組成の溶液を 20 ml 使用し、プローブを加え 42℃ で 20 時間行なう。フィルターは 2×SSC/0.1% SDS 溶液中室温で 5 分間洗浄し、0.1×SSC/0.1% SDS 溶液中で 68℃ 30 分間の洗浄を 2 回行なった後、FUJIX パイオ・イメージアナライザー BAS2000 (富士写真フイルム社製、日本国) による解析を行なった。その結果、心臓、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓において発現が見られ、その中でも肺及び肝臓における発現が比較的多かった (図 1)。また、バンドの鎖長は約 1.6kb であることから、pRLF は不完全長と考えられた。

実施例 6**pRLF の完全長クローニングの取得**

実施例 5 の結果から、pRLF は不完全長と考えられたので、5' RACE

法による 5' 端の取得を行なった。まず、pRLF の挿入 cDNA の最上流に対応する 2 つの PCR 用プライマーを合成した。配列は以下の通りである：

Flf: 5' - GTGCTCAGGTTTGCTCATTA - 3' (配列表の配列番号 2 の 52 - 71 の相補鎖；配列番号 13)。

Flg: 5' - TGCTCTTCACAGCCGCCCT - 3' (配列表の配列番号 2 の 33 - 51 の相補鎖；配列番号 14)。

また、pEF18S のシーケンシング用プライマーを作成した。配列は以下の通りである。

EF1α-2: 5' - GGATCTTGGTTCATTCTCAAG - 3' (配列番号 15；pEF18S のクローニングサイト EcoRI - NotI の EcoRI の外側に位置し、クローニングサイトを覗く方向)。

実施例 1 及び実施例 2 と同様にラット肝初代培養細胞の mRNA より作成した cDNA ライブラリー (独立クローン：3.2×10⁴ 個) のプラスミドを鋳型として、合成したプライマー (Flf 及び EF1α-2) 各 10 pmol を用いて PCR を行なった。Takara LA Taq (宝酒造社製) を使用して、GeneAmpTM PCR System 2400 (パーキンエルマー社製) により 100 μl の容量で PCR (94℃ で 5 分間の変性を行なった後、94℃ で 30 秒間の変性条件、57℃ で 30 秒間のアニール条件、72℃ で 2 分間の合成条件で 35 回の反応を行い、さらに 5 分間 72℃ で合成反応を行なった) を行なった。さらに、この反応液の 4 倍希釈液 1 μl をテンプレートとし、合成したプライマー (Flg 及び EF1α-2) 各 10 pmol を用いて PCR を行なった。条件は初回と同様。この反応液を 2% のアガロースゲルで泳動し、比較的大きく、鮮明なバンドを回収してブレップ-A-2 ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片の塩基配列を直接プライマー：Flg, EF1α-2 で Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing FS Kit (パーキンエルマー社製) を用い、パーキンエルマー社製 377DNA シークエンサーにより解析した。これにより、332 塩基の上流配列 (配列番号 3) を得た。しかし、なおノーザンの解析結果 (全長約 1.6kb) には及ばないため、さらに以下のような 5' RACE を繰り返した。まず、得た上流配列の N 端に対応する 2

つの PCR 用プライマーを合成した。配列は以下の通りである：

F1h：5' - CCAAGTCGGTATCTCATCA - 3' (配列表の配列番号 3 の 118 - 137 の相補鎖；配列番号 16)。

F1i：5' - GGCAGTCCAGTATGCTACAT - 3' (配列表の配列番号 3 の 36 - 55 の相補鎖；配列番号 17)。

ラット脾臓 5' -RACE-Ready cDNA (CLONTECH 社製) を鋳型として、合成したプライマー；F1h 及び Anchor Primer (5' -RACE-Ready cDNA に添付されている；cDNA の 5' 端に付加されたアンカーに対応する) 各 10pmol を用いて PCR を行なった。TaKaRa LA Taq (宝酒造社製、日本国) を使用して、GeneAmpTM PCR System 2400 (パーキンエルマー社製) により 50 μ l の容量で PCR (94℃で 45 秒間の変性条件、57℃で 45 秒間のアニール条件、72℃で 2 分間の合成条件で 30 回の反応を行い、さらに 5 分間 72℃で合成反応を行った) を行った。さらに、この反応液の 10 倍希釈液 4 μ l をテンプレートとし、合成したプライマー；F1i 及び Anchor Primer 各 20pmol を用いて 100 μ l の容量で PCR を行なった。条件は初回と同様。この反応液を 2% のアガロースゲルで泳動し、一番鮮明なバンドを回収してプレップ-A - ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片を PCRTMII ベクター (TA Cloning[®] Kit；Invitrogen 社製) にクローン化した。得られたコロニーを鋳型とし、M13 Reverse Primer (5' -CAGGAACAGCTATGAC - 3'；配列番号 18)、M13(-20) Forward Primer (5' -GTAAACGACGGCCAGTG - 3'；配列番号 19) 各 7pmol を用いて PCR を行なった。AmpliTaq[®](パーキンエルマー社製) を使用して、GeneAmpTM PCR System 2400 (パーキンエルマー社製) により 30 μ l の容量で PCR (94℃で 5 分間の変性を行った後、94℃30 秒間の変性条件、47℃で 30 秒間のアニール条件、72℃で 1 分間の合成条件で 35 回の反応を行い、さらに 5 分間 72℃で合成反応を行った) を行った。反応液は 2% のアガロースゲルで泳動し、バンドを回収してプレップ-A - ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片の塩基配列を Anchor Primer 及び F1i で Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing FS Kit (パーキンエ

ルマー社製) を用い、パーキンエルマー社製 377DNA シークエンサーにより解析した。これにより、さらに 335 塩基の上流配列 (配列番号 4) を得た。ここで、この上流配列の N 端に対応する PCR 用プライマーを合成した。配列は以下の通りである：

F1j：5' - TCCTCTCGACAGCACTCC - 3' (配列表の配列番号 4 の 64 - 83 の相補鎖；配列番号 20)。

先のラット脾臓 5' -RACE-Ready cDNA を鋳型とした、F1h 及び Anchor Primer を用いた PCR 反応液の 10 倍希釈液 4 μ l を鋳型として、合成したプライマー；F1j 及び Anchor Primer 各 20pmol を用いて PCR を行なった。TaKaRa LA Taq (宝酒造社製、日本国) を使用して、GeneAmpTM PCR System 2400 (パーキンエルマー社製) により 100 μ l の容量で PCR (94℃で 30 秒間の変性条件、53℃で 30 秒間のアニール条件、72℃で 1 分 30 秒間の合成条件で 30 回の反応を行い、さらに 5 分間 72℃で合成反応を行った) を行った。反応液は 2% のアガロースゲルで泳動し、一番鮮明で、尚かつ長いバンドを回収してプレップ-A - ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片を PCRTMII ベクターにクローン化し、前回と同様に PCR を用いてコロニーから断片を調製し、塩基配列を決定した [プライマーは M13 Reverse Primer (前述) 及び T7 Primer (5' -TAATACGACTCACTATAGG - 3'；配列番号 21)]。これにより、さらに 317 塩基の上流配列 (配列番号 5) を得、全長は合計で 1571 塩基に達し (配列番号 6)、ノーザンの解析結果と一致したことから、ほぼ完全長を得たと考えられた。

DNA 解析ソフト "DNASIS" (日立ソフトエンジニアリング社製) を用いてホモロジーサーチを行ったところ、配列番号 6 のアンチセンスがト Bcl-2 binding component 3 (GENBANK ACCESSION NO. U82987) と塩基レベルで 85.4% の相同性を持つことが判明した。一方、発現クローニングで得られたクローン pRLF (配列番号 2) 中には最高でも 24 アミノ酸の ORF が存在しないことが、同ソフトによる解析で明らかになった。よって、クローン pRLF がコードする蛋白質 (ペプチド) そのもの

に神経再生活性があるのではなく、クローン pRLF を導入することによってなんらかの機構により COS1 細胞から神経再生活性をもつ物質が分泌されている可能性が考えられた。そこで、以下のような実験を行った。

実施例 7

pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清からの神経再生促進因子の精製

pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清の調製

pRLF を導入した時に COS1 細胞培養上清中に分泌される神経再生促進因子を精製するため、pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清を約 300L 調製した。以下にその詳細を示す。まず、pRLF クローンを $50 \mu\text{g/ml}$ の Ampicillin を含む LB 培地で 37°C 一夜振とう培養 (3L の坂口コルベン当たり 1.5L の培地を入れた) し、遠心により 170L の培養液より過重量 850g の大腸菌を得た。この大腸菌 5g を 1 バッチとして、プラスミド抽出キット; RPM[®]-4G (BIO 101 社製) を用いて pRLF プラスミドを抽出した。これにより、170L の一夜培養液より 300mg の pRLF プラスミドを得た。

プラスミド pRLF の COS1 細胞へのトランスフェクションは、前述の方法 (実施例 3) により行い、計 294L の pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清を取得し、精製の供給源とした。

pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清からの神経再生促進因子の精製

取得した上清 294L (総蛋白質量; 81678mg) を一度に処理することができなかったため、30-50L の 7 つのロットに分けて精製を実施した。このうち、あるひとつのロットにおける精製例を代表として説明する。尚、精製の全ステップに於いて、神経再生促進活性は前述した DRG アッセイ系を用いて測定した。また、蛋白質の定量は、ステップ (1) から (3) までではクローマジー色素結合法 (PIERCE 社製試薬) を用いて、またそれ以降のステップでは 280nm の吸収をもとに実施した。以下にそれぞれのロットについてまとめる：

ロット 1 : 42.81L, 蛋白濃度 0.297mg/ml, 総蛋白質量 12698mg ;
 ロット 2 : 44.73L, 蛋白濃度 0.241mg/ml, 総蛋白質量 10760mg ;
 ロット 3 : 34.16L, 蛋白濃度 0.301mg/ml, 総蛋白質量 10290mg ;
 ロット 4 : 43.05L, 蛋白濃度 0.266mg/ml, 総蛋白質量 11438mg ;
 ロット 5 : 46.30L, 蛋白濃度 0.261mg/ml, 総蛋白質量 12070mg ;
 ロット 6 : 43.92L, 蛋白濃度 0.290mg/ml, 総蛋白質量 12752mg ;
 ロット 7 : 39.15L, 蛋白濃度 0.298mg/ml, 総蛋白質量 11670mg .

(1) 限外濾過膜分画

まず、pRLF 導入 COS1 細胞の培養上清 ロット 1 (42.81L, 蛋白濃度 ; 0.297mg/ml, 総蛋白質量 ; 12698mg) から死細胞片を除くため 8000RPM で 30 分遠心後、上清を回収した。次に、得られた上清を、4℃にて分子最 100KDa カット限外濾過膜 (ポールフィルترون社製、膜面積 0.46m^2) で濾過した後、濾液を分子最 5KDa カット限外濾過膜 (ポールフィルترون社製、膜面積 0.46m^2) にて濃縮した。得られた 5KDa 以下画分 (40.73L, 蛋白濃度 ; 検出限界以下)、5KDa 以上 100KDa 以下画分 (320ml, 蛋白濃度 ; 39.252mg/ml, 総蛋白質量 ; 12560mg)、100KDa 以上画分 (800ml, 蛋白濃度 ; 3.084mg/ml, 総蛋白質量 ; 2467mg) の 3 つの画分の DRG アッセイの結果、神経再生促進活性は 5KDa 以上 100KDa 以下画分に検出されたため、この 5KDa 以上 100KDa 以下画分を次のステップに進めた。

(2) TSKgel QAE-トヨパール 550C (強陰イオン交換クロマトグラフ

イー)

(1) で得られた 5KDa 以上 100KDa 以下画分 (320ml, 蛋白濃度 ; 39.252mg/ml, 総蛋白質量 ; 12560mg) を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて 4 倍希釈した後、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて予め平衡化してあった TSKgel QAE-トヨパール 550C カラム (東ソー社製、日本国 ; $\phi 5\text{cm} \times 10\text{cm}$) に 4°C にて 15ml/min の流速で添加し、素通り画分 Q1 (1900ml, 蛋白濃度 0.106mg/ml, 総蛋白質量 201mg) を溶出した。次

に、溶出液を 750mM NaCl を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に換えて、5ml/min の流速で吸着画分 Q2 (590ml, 蛋白濃度 20.631mg/ml, 総蛋白質量 12172mg) を溶出した。DRG アッセイの結果、神経再生促進活性は吸着画分 Q2 に検出されたため、この吸着画分 Q2 を次のステップに進めた。

(3) Sephacryl S-200 HR (ゲル濾過クロマトグラフィー)

(2) で得られた TSKgel QAE-トヨパール 550C カラム吸着画分 Q2 (590ml, 蛋白濃度 20.631mg/ml, 総蛋白質量 12172mg) を限外濾過ユニット (アミコン社製; YM3 膜、直径 76mm) で 100ml まで濃縮した。その後、100ml の内の 50ml を PBS にて予め平衡化してあった Sephacryl S-200 HR カラム (ファルマシア バイオテク社製、 ϕ 5cm x 100cm) に 4℃にて 2.5ml/min の流速で添加した。溶出液を 50ml ずつチューブに集め、DRG アッセイを行ったところ神経再生促進活性は分子質量 30kDa から 5kDa に相当する Fr10 から Fr16 (350ml, 蛋白濃度 4.303mg/ml, 総蛋白質量 1506mg) に検出された。同様にして残りの 50ml も Sephacryl S-200 HR カラムによる分画を行い、活性画分 Fr10 から Fr16 (350ml, 蛋白濃度 4.480mg/ml, 総蛋白質量 1568mg) を取得した。このようにして 2 回にわたったクロマトグラフィーにより取得した Sephacryl S-200 HR 活性画分を 1 つの画分 (700ml, 蛋白濃度 4.391mg/ml, 総蛋白質量 3074mg) にまとめ、限外濾過ユニット (アミコン社製; YM3 膜、直径 76mm) で 50ml まで濃縮した。そして再度、Sephacryl S-200 HR カラム (ファルマシア バイオテク社製、 ϕ 5cm x 100cm) に 4℃にて 2.5ml/min の流速で添加した。溶出液を 50ml ずつ分画し、DRG アッセイを行ったところ神経再生促進活性は分子質量 15kDa に相当する Fr13,14 (100ml, 蛋白濃度 0.224mg/ml, 総蛋白質量 22.039mg) に検出されたため、この画分を次のステップに進めた。

このようにして、7 つのロットについて上記 (1) から (3) までの精製を行い、それぞれのロットについて Sephacryl S-200 HR 活性画分

を取得した。以下にそれぞれのロットの Sephacryl S-200 HR 活性画分についてまとめる：

ロット 1 : 100ml, 蛋白濃度 0.224mg/ml, 総蛋白質量 22.039mg;
 ロット 2 : 50ml, 蛋白濃度 0.313mg/ml, 総蛋白質量 15.672mg;
 ロット 3 : 50ml, 蛋白濃度 0.366mg/ml, 総蛋白質量 18.300mg;
 ロット 4 : 50ml, 蛋白濃度 0.316mg/ml, 総蛋白質量 15.800mg;
 ロット 5 : 100ml, 蛋白濃度 0.230mg/ml, 総蛋白質量 22.950mg;
 ロット 6 : 50ml, 蛋白濃度 0.305mg/ml, 総蛋白質量 15.240mg;
 ロット 7 : 50ml, 蛋白濃度 0.245mg/ml, 総蛋白質量 12.250mg.

(4) Shodex IEC DEAE-2025 (弱陰イオン交換クロマトグラフィー)

(3) で得られたロット 1, Sephacryl S-200 HR 活性画分 (100ml, 蛋白濃度 0.224mg/ml, 総蛋白質量 22.039mg) とロット 2, Sephacryl S-200 HR 活性画分 (50ml, 蛋白濃度 0.313mg/ml, 総蛋白質量 15.672mg) を 1 つの画分 (150ml, 蛋白濃度 0.251mg/ml, 総蛋白質量 37.711mg) にまとめ、限外濾過ユニット (アミコン社製; YM3 膜、直径 76mm) で 5 ml まで濃縮した。これに 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 50 ml 加え、再び 5 ml まで濃縮した。さらにこの操作をもう一度繰り返し、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に置換された Sephacryl S-200 HR 活性画分 (12ml, 蛋白濃度 3.143mg/ml, 総蛋白質量 37.711mg) を得た。この画分を展開溶媒 A に 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、展開溶媒 B に 750mM NaCl を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、0% B で平衡化した Shodex IEC DEAE-2025 カラム (昭和電工社製、日本国; ϕ 2cm x 15cm) に、流速 2ml/min で室温にて注入した。注入終了後、10 分間で 20% B にした後、さらに 20% B から 60% B まで 70 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 4ml ずつ分画し、DRG アッセイを行ったところ神経再生促進活性は約 250mM の NaCl 濃度を有する Fr39,40 (8ml, 蛋白濃度 0.02mg/ml, 総蛋白質量 0.16mg) に検出されたため、この画分を次のステップに進めた。

同様にして残りのロットの Sephacryl S-200 HR 活性画分についてもロット3とロット4を合わせた画分、ロット5とロット6を合わせた画分、およびロット7の3回にわけ、それぞれ Shodex IEC DEAE-2025 による精製を行い、Shodex IEC DEAE-2025 活性画分を取得した。

以下にそれぞれのロットの Shodex IEC DEAE-2025 活性画分についてまとめる：

ロット 1 & 2 : 8ml, 蛋白濃度 0.02mg/ml, 総蛋白質量 0.16mg ;
 ロット 3 & 4 : 8ml, 蛋白濃度 0.02mg/ml, 総蛋白質量 0.16mg ;
 ロット 5 & 6 : 8ml, 蛋白濃度 0.025mg/ml, 総蛋白質量 0.2mg ;
 ロット 7 : 8ml, 蛋白濃度 0.01mg/ml, 総蛋白質量 0.08mg.

(5) YMC-Pack PROTEIN RP (逆相クロマトグラフィ)

(4) で得られた各ロットの Shodex IEC DEAE-2025 活性画分を 1 つの画分 (32ml, 蛋白濃度 0.0188mg/ml, 総蛋白質量 0.6mg) にまとめ、限外濾過ユニット (アミコン社製 ; YM 3 膜、直径 43mm) で 4ml まで濃縮した。この画分に 2-プロパノール 0.5ml、アセトニトリル 0.5ml、トリフルオロ酢酸 (TFA) 0.0025ml を加え、最終体積 5.0025ml、最終有機溶媒濃度 20%、TFA 濃度 0.05 % に調製した。これを展開溶媒 A に 0.1% TFA、展開溶媒 B に 0.08% TFA を含む 2-プロパノール/アセトニトリル=1/1 (容積比) を用い、40% B で平衡化した YMC-Pack PROTEIN RP カラム (YMC 社製、φ 2.1mm x 150mm) に、流速 0.2ml/min で注入した。注入終了後、40% B から 60% B まで 30 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 0.4ml ずつ分画し、DRG アッセイを行ったところ神経再生促進活性は約 50% の有機溶媒濃度を有する Fr44, 45 (0.8ml, 蛋白濃度 0.012mg/ml, 総蛋白質量 0.0096mg) に検出されたため、この画分を次のステップに進めた。

(6) 電気泳動ゲル上の活性蛋白質バンドの同定

(5) で得られた YMC-Pack PROTEIN RP 活性画分の一部を用いて電気

泳動による分析を行った。電気泳動は常法 (Laemmli, Nature, 227 巻、680-685 頁、(1970)) に従って行った。活性画分 0.8ml のうちの 5.4μl を遠心エバポレーションし、還元剤を含まないドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ゲル電気泳動サンブルバッファを 10 μl 加え、95℃ で 5 分処理した後、15-25% SDS-ポリアクリルアミドブレキャストゲル (第一化学薬品社製、日本国) を用いて SDS ゲル電気泳動し、2D-銀染色試薬「第一」銀染色キット (第一化学薬品社製、日本国) で染色した。分子置マーカーには「第一」・III 低分子量マーカー (第一化学薬品社製、日本国) を用いた。その結果、電気泳動ゲル上には複数のバンドが検出され、活性画分には複数の蛋白質が存在していることが判明した。そこで電気泳動ゲル上の活性蛋白質バンドの特定を行うため、電気泳動ゲルからの神経再生促進活性の抽出実験を行った。活性画分 0.8ml のうちの 8μl を遠心エバポレーションし、還元剤を含まない SDS ゲル電気泳動サンブルバッファを 10 μl 加え、55℃ で 10 分処理した後、15-25% SDS-ポリアクリルアミドブレキャストゲル (第一化学薬品社製、日本国) を用いて SDS ゲル電気泳動を行った。分子置マーカーには、ブレステイン・ブロードレンジマーカー (ニュウイングランドバイオラボ社製) を用いた。泳動終了後、ブレステイン・ブロードレンジマーカーの分子置 16.5KDa バンドをめやすとして、サンブルを添加した領域のうち 16.5KDa バンドより低分子量領域を幅 1.6mm ずつ 14 本のゲルにカットした。カットした 14 本のゲルをそれぞれ 1.25 μg のトランスフェリンを含む 500 μl の精製水を入れたエツベンドルフチューブの中に入れた後、チューブをローターに設置し 4℃ にて回転させた。16 時間後、抽出液を回収し、新たに 1.25 μg のトランスフェリンを含む 500 μl の精製水を加えた。4℃ にて 4 時間回転させた後、抽出液を回収し、最初に回収した抽出液とあわせてゲル中に存在した蛋白質の抽出液 1ml を取得した。その後、抽出液中に存在する遊離 SDS を除くため各チューブに 1M リン酸カリウム (pH 6.8) を 20 μl 加え、4℃ にて 4 時間放置した。さらに、生成した沈殿を除去するため、10000 rpm、10 分間の遠心

を行い、上清を回収する事によりゲル中に存在した蛋白質の抽出液を得た。この抽出液をアッセイ培地で透析した後、DRG アッセイを行ったところ、神経再生促進活性は分子量約 14500Da に相当する No.3 及び No.4 のゲル抽出液に検出された。前述の銀染色を行った泳動ゲル上にはこの分子量に相当する位置に蛋白質バンドが存在していたため、この分子量約 14500Da の蛋白質が活性蛋白質であることが判明した。

(7) 電気泳動による分離とポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜へのエレクトロブロットティング

(6) に記述したように YMC-Pack PROTEIN RP 活性画分中の活性蛋白質は電気泳動により他の蛋白質と分離できることがわかったため、残りの YMC-Pack PROTEIN RP 活性画分全てを電気泳動により分離した。YMC-Pack PROTEIN RP 活性画分 786.6 μ l を遠心エバポレーションし、還元剤を含まない SDS ゲル電気泳動サンブルバッファーを 30 μ l 加え、95°C で 5 分処理した後、15-25% SDS-ポリアクリルアミドブレキャストゲル(第一化学薬品社製、日本国)を用いて SDS ゲル電気泳動した。分子量マーカーには、「第一」・III 低分子量マーカー(第一化学薬品社製、日本国)及びブレステインド・ブロードレンジマーカー(ニューイングランドバイオラボズ社製)を用いた。泳動終了後、セミドライ転写装置(オール社製)を用いて、常法に従い、150mA の一定電流で 3 時間かけ PVDF 膜(パーキンエルマー社製 ProBlott)に転写を行った。陽極液に、0.3M Tris, 20%メタノール, pH10.4、転写膜液に、25mM Tris, 20%メタノール, pH10.4、陰極液に、25mM Tris, 40mM アミノカプロン酸、20%メタノール, pH10.4 を用いた。転写された膜をクマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)染色液(40%メタノール、1%酢酸中に 0.1%の CBB R-250 を含む)で染色し、50%メタノールで脱染色したところ、(6)に記述した銀染色と同等の染色パターンが検出された。活性本体である分子量約 14500Da の蛋白質バンドも染色されており、ここに pRFLF 導入 COS1 細胞培養上清中の神経再生促進因子の精製が完了した。取得され

た活性本体蛋白質の量は CBB 染色の染色度から約 200ng と推定された(図 2)。

実施例 8

神経再生促進因子の部分アミノ酸配列の分析

岩松の方法(岩松ら、新基礎生化学実験法、第 4 巻、33~84 頁(丸善刊、東京、日本国);岩松明彦、生化学、第 63 巻、第 2 号、139-143 頁、(1991)(日本国);Akihiro Iwamatsu, Electrophoresis, 第 13 巻、142-147 頁、(1992))により、実施例 7 の(7)で得られた PVDF 膜上に転写された分子量約 14500Da の神経再生促進活性性を有する蛋白質のアミノ酸配列の分析を行った。

(1) 還元 S-カルボキシメチル化

実施例 7 の(7)で得られた PVDF 膜上の CBB 染色された分子量約 14500Da の神経再生促進活性性を有する蛋白質バンドを切り出し、エッペンドルフチューブに入れた 1mg のジチオスライトール(DTT)を含む還元溶液(8M グアニジン、0.3%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.125M リジンを含む 0.5M トリス塩酸緩衝液(pH 8.3))100 μ l 中に浸し、60°C にて 1 時間放置した。これに、3mg のモノヨード酢酸を加え、チューブを遠光して 15 分間激しく撹拌した。その後、PVDF 膜を精製水、2%アセトニトリル、0.1%SDS で順次洗浄して膜上に残っている過剰の試薬を除去了。このようにして PVDF 膜上にて還元 S-カルボキシメチル化された分子量約 14500Da の神経再生促進活性性を有する蛋白質を取得した。

(2) ペプチド断片化とペプチドマッピング・アミノ酸配列分析

取得した蛋白質から複数の内部アミノ酸配列情報を得るため、酵素消化により蛋白質をペプチドに断片化した。酵素消化に先立ち、PVDF 膜を 0.5%ポリビニルピロリドン(PVP)-40、1mg のメチオニンを含む 100mM 酢酸 100 μ l に浸し、室温で 30 分間放置することにより膜上の蛋白質

未結合部分をブロックした。その後、10%アセトニトリルで洗浄して過剰の試薬を除去した。洗浄した膜を 10%アセトニトリルを含む 20mM トリス塩緩衝液 (pH 9.0) 20 μ l の入ったチューブに移し、リシルエンドペプチダーゼ (Achromobacter Protease I ; 和光純薬工業製、日本国) 5pmol を加え、40℃にて 3 時間の消化を行った。酵素消化により断片化され PVDF 膜から遊離してきたペプチドフラグメントを消化液中に回収した。消化液中に存在しているペプチドフラグメントを展開溶媒 A に 0.05% TFA、展開溶媒 B に 0.02% TFA を含むイソプロパノール : アセトニトリル = 7 : 3 の混液を用いて、Symmetry C18 逆相カラム (ウオーターズ社製、 ϕ 1.0mm x 50mm) で、カラム温度 40℃、流速 0.1ml/min、1% から 50%B を 30 分の直線濃度勾配にて展開することにより分取した (図 3)。得られたそれぞれのペプチドフラグメントを気相アミノ酸シークエンサー (島津製作所製、PPSQ-2) にてエドマン分解後、順次回収された N 末端の PTH アミノ酸を、アイソクラティック溶出法による C18 逆相カラムクロマトグラフィーにて同定を行った。同定可能であったフラグメントのアミノ酸配列を次にまとめた (アミノ酸は一字表記による) :

AP 2 : P G E C L R V R G E V A (配列番号 22) ;

AP 4 : L P D G Y E (配列番号 23) ;

AP 6 : D S N N L C L H F N (配列番号 24) .

上記アミノ酸配列のデータベースによる検索を行ったところ、ヒトガレクチン-1 (SWISS-PROT データベース登録番号 P09382) のアミノ酸配列と完全に一致していた。この結果より pRLF 導入 COS1 細胞培養上清中の神経再生促進因子はサルガレクチン-1 である可能性が最も高いと結論した。

実施例 9

ヒトガレクチン-1 cDNA の取得

まず、GENBANK ACCESSION NO. J04456 をもとにヒトガレクチン-1 cDNA に対応する PCR 用プライマーを合成した。配列は以下の通りである :

HLEG1 : 5' - TCGCGCTGCCGGGAACATC - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 15-34 ; 配列番号 25) ;

HLEG2 : 5' - GAACATCTCTCTGGACTCAA - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 28-47 ; 配列番号 26) ;

HLEG6 : 5' - GCTGCGCTTTATTGGGGCCA - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 472-491 の相補鎖 ; 配列番号 27) ;

HLEG8 : 5' - GAGAGAGCGCGCCCATTTGGGGCGCATGGGCTGGC - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 463-482 の相補鎖の 5' に NotI サイトを付加した ; 配列番号 28) .

SuperScript™ Human Liver cDNA Library (GIBCO BRL 社製) の大腸菌ストック 2 μ l をテンプレートとし、合成したプライマー (HLEG1 及び HLEG6) 各 40pmol を用いて PCR を行なった。TaKaRa LA Taq (宝酒造社製、日本国) を使用して、GeneAmp™ PCR System 2400 (パーキンエーラー社製) により 100 μ l の容量で PCR (94℃で 5 分間の変性を行い、94℃で 30 秒間の変性条件、60℃で 30 秒間のアニール条件、72℃で 1 分間の合成条件で 35 回の反応を行い、さらに 5 分間 72℃で合成反応を行った) を行った。さらに、この反応液 1 μ l をテンプレートとし、合成したプライマー (HLEG2 及び HLEG8) 各 40pmol を用いて PCR を行なった。条件はアニール温度が 55℃となる以外初回と同様。この反応液をフェノールクロロホルム (1 : 1) 処理後、1/10 量の 3M NaOAc 及び 2 倍量のエタノールを加えて遠心し、ペレットを得た。ペレットは T4 DNA polymerase (ペーリンガーマンハイム社製) で平滑化し、NotI で消化後、2% のアガロースゲルで泳動し、予想される約 460bp の大きさの断片を回収してブレイプ-A-ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片を EcoRI で消化した後 T4 DNA polymerase で平滑化し、さらに NotI で消化した pEF18S にクローニングした (宿主は E.coli DH5 を使用した) . 得られたクローンの挿入配列をプライマー ; EFl α -1 (pEF18S のクローニングサイト EcoRI-NotI の EcoRI の外側に位置し、クローニングサイトを覗く方向 ; 5' - CCTCAGACAGCTGCTTCAAAG - 3' ; 配列番号

29), polyAC2 (pEF18S のクロニングサイト EcoRI-NotI の NotI の外側に位置し、クロニングサイトを覗く方向: 5'-TGCCATTCATTTATGTTTCAG-3'; 配列番号 30) 各 7pmol を用いて PCR (94°C 5 分間の後に、94°C 30 秒間/50°C 30 秒間/72°C 1 分間の条件で 35 回の反応を行う) により増幅した後、2% のアガロースゲルで泳動し、予想される約 500bp の大きさの断片を回収してプレップ-A-ジーン DNA 精製キットで精製した。この断片の塩基配列をプライマー: EFl α -1, polyAC2 で Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing FS Kit (パーキンエルマー社製) を用い、パーキンエルマー社製 377DNA シークエンサーにより解析した。これにより、開始コドンから終端コドンまでの正しいヒトガレクチン-1 cDNA の塩基配列を有するクローン pEFGalI (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 50-457) を得た。

実施例 10

ヒトガレクチン-1 cDNA クローン pEFGalI の COSI 細胞発現蛋白質 (以下この蛋白質を COSI 細胞発現 GalI (1-134) と称す。) の DRG 活性の確認

実施例 9 で取得したヒトガレクチン-1cDNA を組み込んだプラスミド pEFGalI を COSI 細胞へトランスフェクションし、COSI 細胞培養液中、および COSI 細胞から抽出した GalI (1-134) が神経再生促進活性を有するかどうかの確認を行った。

クローン pEFGalI は 50 μ g/ml の Ampicillin を含む 100ml の LB 培地で一夜培養した後、遠心分離により得た菌体から QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN 社製) を用いてプラスミドを抽出した。プラスミド pEFGalI の COSI 細胞へのトランスフェクションは、トランスフェクタム試薬 [プロメガ社製、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(DGGS)] を用いて行った。培養表面積 225cm² の組織培養用プラスティックフラスコに 5 x 10⁶ 個の COSI 細胞を蒔き、10%FBS を含む IMDM 培地中にて一晩培養した。IMDM 培地 20ml で洗浄後、新たに IMDM 培地 6.5ml を添加した。

さらにプラスミド pEFGalI 65 μ g を含む IMDM 培地 6.5ml とトランスフェクタム試薬 325 μ g を含む IMDM 培地 6.5ml を混合し、これを添加し、37°C にて 6 時間培養した。その後、培養液を吸引除去し、新たに 10%FBS を含む IMDM 培地 52ml を添加し、2 日間培養を行った。培養終了後、培養上清 50ml および細胞を回収した。培養上清は 5mM DTT を含む PBS 2L で一晩透析後、超過した。一方細胞は 100mM ラクトース、5mM DTT を含む PBS 10ml 中にホモジナイズした。その後、4°C にて 10000G、30 分の遠心分離を行い、上清を回収し、5mM DTT を含む PBS 2L で一晩透析後、超過し、細胞抽出液とした。得られた培養上清および細胞抽出液をそれぞれ 5mM DTT を含む PBS にて平衡化したラクトースアガロースカラム (ホーネン社製、 ϕ 5.0 mm x 50 mm) に、流速 0.25ml/min で添加し、素通り画分を溶出した。次に、溶出液を 100mM ラクトース、5mM DTT を含む PBS に換えて、吸着画分を溶出した。電気泳動による分析の結果、培養上清および細胞抽出液とも吸着画分に分子量 14500Da の GalI (1-134) が検出された。そこでそれぞれの吸着画分をアッセイ培地にて十分透析した後 DRG アッセイを行ったところ、5 - 50 pg/ml の濃度 (ゲルの染色度から推定) で高い神経再生促進活性が検出された。これにより、COSI 細胞で発現した GalI (1-134) は培養液および細胞中に存在し、いずれも高い神経再生促進活性を有していることが確認された。

実施例 11

GalI (1-134) の大腸菌発現用ベクターの構築

大腸菌発現ベクターである pET-3d (ストラタジーン社製) によって、GalI (1-134) を発現させるために、次のことを行った。まず、pEFGalI を鋳型として、2 本の PCR 用プライマー: HLEG12, HLEG14 を用いて PCR (94°C 5 分間の後に、94°C 30 秒間/60°C 30 秒間/72°C 1 分間の合成条件で 25 回の反応を行い、さらに 72°C で 5 分間反応させる) を行った。増幅されたヒトガレクチン-1 の開始コドンから終端コドンまでを含む断片を NcoI と BamHI で消化後 0.8% のアガロースゲルで泳動し、約 420bp

の大きさの断片を回収してブレップ-A - ジーン DNA 精製キットで精製し、NcoI と BamHI で消化した pET-3d に挿入 (宿主は *E. coli* DH5 α を使用した) した。正しいヒトガレクチン-1 cDNA の塩基配列を有するクローン pETGall (1-134) (ベクターの NcoI から BamHI までの塩基配列を配列番号 7 に示す) を、塩基配列の解析により選択した、GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (ファルマシア社製) を用いてプラスミドを抽出し、Epicurian Coli BL21(DE3) Competent Cells (ストラタジーン社製; Lysogenic Lambda phage の Lac UV5 下流に T7 RNA polymerase 遺伝子がある) に形質転換して得られた大腸菌株を Gall (1-134) 発現用の形質転換体とした。ここで用いた PCR 用プライマーの配列は以下の通りである:

HLEG12: 5' - ACAGTGGATCCTTATCAGTCAAGGCCACACATTG - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 436-457 の相補鎖の 5' 端に BamHI サイトを付加した; 配列番号 31);

HLEG14: 5' - GAGAGACCATGGCTTGGTCTGTCGCC - 3' (GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 50-69 の 5' 端に NcoI サイトを付加した; 配列番号 32)。

実施例 1.2

大腸菌で発現した Gall (1-134) の精製と活性確認

ヒトガレクチン-1 cDNA を組み込んだ大腸菌発現用プラスミド pETGall (1-134) を導入した大腸菌より Gall (1-134) を取得し、神経再生促進活性を有するかどうかの確認を行った。

実施例 1.1 で得られたクローンを、アンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地上に塗布し、37°C で一晚培養してコロニーを形成させ、このコロニー 1 個をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 50ml で振盪培養し、この培養液を初発の OD₆₀₀ が 0.2 となるようにアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 1000ml に加え、OD₆₀₀ が 0.5-0.6 に至るまで 37°C で振盪培養した。次いで最終濃度が、0.1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 3 時間振盪培養して、Gall (1-134) の発現を誘導した。

菌体培養液 1L を 1000G で 30 分の遠心分離を行い、Gall (1-134) 発現菌体ベレットを得た。ベレットを 20ml の PBS に懸濁し、氷冷下に超音波破碎した。菌体破碎液を 1000G で 30 分の遠心分離し、上清中に可溶性蛋白として Gall (1-134) を回収した。回収した上清を 2L の 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で一晚透析後、展開溶媒 A に 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、展開溶媒 B に 500mM NaCl を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、0% B で平衡化した Shodex IEC DEAE-2025 カラム (昭和電工社製、日本国; ϕ 2cm x 15cm) に、流速 2ml/min で室温にて注入した。注入終了後、0% B から 30% B まで 60 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 4ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 80mM の NaCl 濃度を有する画分に分子量 14500Da の Gall (1-134) と思われるバンドが検出されたため、この画分 (15ml) を次のステップに進めた。ここで、Gall (1-134) のアミノ酸配列には 6 個のシステインが含まれているため、神経再生促進活性を有した pRLF 導入 COS1 細胞培養上清中のヒトガレクチン-1 には SS 結合が形成されていた可能性が高い。そこで酸化剤として硫酸銅を用いて SS 結合形成反応 (リフォールディング) を行った。DEAE カラムの Gall (1-134) 画分 (15ml) を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 20 倍に希釈し、最終濃度 0.0001% になるように 1% 硫酸銅水溶液を添加した後、4°C にて一晚放置した。反応液 300ml を限外濾過ユニット (アミコン社製; YM 3 膜、直径 76mm) を用いて濃縮し、さらに 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) にバッファ交換した。(最終溶液量 50ml) これを展開溶媒 A に 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)、展開溶媒 B に 500mM NaCl を含む 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用い、0% B で平衡化した TSKgel SP-5PW カラム (東ソー社製、日本国; ϕ 7.5mm x 75mm) に、流速 0.5ml/min で室温にて注入した。注入終了後、0% B から 40% B まで 60 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 1ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 150mM の NaCl 濃度を有する画分に分子量 14500Da の Gall (1-134) と思われるバンドが検出されたため、この画分 (8ml)

を次のステップに進めた。SP カラムの Gall (1-134) 画分 (8ml) を展開溶媒 A に 0.1%TFA、展開溶媒 B に 0.1%TFA を含む 80%アセトニトリルを用い、40% B で平衡化した YMC PROTEIN RP カラム (YMC 社製 ϕ 10mm x 250mm) に、流速 2.0ml/min で室温にて注入した。注入終了後、40% B から 50% B まで 60 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 2ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 34%と約 36%のアセトニトリル濃度を有する二つの画分に分子量 14500Da の Gall (1-134) と思われるバンドだけが検出された。この二つのバンドは非還元下の電気泳動では移動度が若干異なるが、還元処理後の電気泳動では移動度が一致していた。このことより、この二つのバンドは SS 結合架橋様式の異なる Gall (1-134) であることが推測された。

このバンドが Gall (1-134)であることを確かめるため、約 36%のアセトニトリル濃度で溶出された画分を用いて N 末端アミノ酸配列分析およびアミノ酸組成分析を行った。

まず、プロテインシンクエンサー (パーキンエルマー社製、492 型) を用いて N 末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、次に示す N 末端アミノ酸配列が検出された (X は未確定である) :

AlaXGlyLeuValAlaSerAsnLeuAsnLysProGlyGluXLeuArgValArg

(配列番号 33)

この配列は、Gall (1-134) の N 末端アミノ酸配列に一致しており、PROTEIN RP カラムにより精製した蛋白が Gall (1-134) であることが確認された。次に 6N 塩酸による酸加水分解後のアミノ酸組成分析を行った。サンプルを PICO-TAG ワークステーション (ウォータース社製) を用いて 6N 塩酸による気相酸加水分解 (150°C、1 時間) を行った後、AccQ-Fluor 試薬 (ウォータース社製) により蛍光誘導体化反応を行った。その後、AccQ-Tag アミノ酸分析システム (ウォータース社製) により、アミノ酸分析を行った。その結果、次に示すアミノ酸組成比が検出された。括弧内に Gall (1-134) の理論値を示す :

Asp:22.18(22), Ser:5.51(5), Glu:10.30(10), Gly:11.38(11), His:2.12

(2), Arg:5.10(5), Thr:3.89(4), Ala:13.90(14), Pro:7.09(7), Tyr:2.08(2), Val:9.23(10), Met:1.15(1), Lys:7.97(8), Ile:3.29(4), Leu:11.85(12), Phe:9.96(10) (Cys, Trp は未確定)。

このように精製蛋白のアミノ酸組成比は Gall (1-134) の理論値と非常によく一致しており、精製蛋白は Gall (1-134) であり、その純度は非常に高いことが確認された。

同様にして約 34%のアセトニトリル濃度で溶出された画分についても N 末端アミノ酸配列分析およびアミノ酸組成分析を行った。その結果、いずれの分析においてもこの画分に溶出された蛋白が Gall (1-134) であることが確認された。そこでアミノ酸分析の結果よりサンプル中の Gall (1-134) の濃度を決定し、それぞれの画分を 0.5、5、50、500、5000pg/ml にアッセイ培地により調整後、DRG アッセイにより神経再生促進活性を測定した。その結果、両画分の Gall (1-134) は 0.5pg/ml から 500pg/ml において濃度依存的に神経再生促進活性を示した (図 4)。これにより、硫酸銅による酸化行程を経て分子内に SS 結合を形成した大腸菌発現 Gall (1-134) は神経再生促進活性を有していることが確認された。

実施例 1.3

大腸菌発現 Gall (1-134) の SS 結合架橋様式の同定

実施例 1.2 で取得した大腸菌発現 Gall (1-134) (約 36%のアセトニトリル濃度で溶出された画分) の SS 結合架橋様式の同定を酵素消化後のペプチドフラグメントの質量分析を行うことにより実施した。大腸菌発現 Gall (1-134) 画分 50 μ l (15 μ g 相当; アミノ酸分析により濃度決定) を遠心エバポレーションした後、100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 20 μ l に溶解し、トリプシン (ペーリンガー社製) 0.6 μ g を加えて、37°C にて 16 時間の消化を行った。消化液中に存在しているペプチドフラグメントを展開溶媒 A に 0.05% TFA、展開溶媒 B に 0.02% TFA を含むイソプロパノール:アセトニトリル=7:3 の混液を用いて、

Symmetry C18 逆相カラム (ウオーターズ社製、φ2.0mm x 50mm) で、カラム温度 40℃、流速 0.25ml/min、1% から 50% B を 50 分の直線濃度勾配にて展開することにより分取した (図 5)。得られたそれぞれのペプチドフラグメント溶液の一部 (0.5μl) をサンブルプレート上にスポットし、さらにアセトニトリル:0.1%TFA=50:50 の溶液に 10mg/ml の濃度で溶解した a-cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)、0.5μl を添加し、混合後風乾した。これを Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight(MALDI-TOF)型質量分析計 (パーセプティブ社製、Voyager Elite) により質量分析を行った。以下に、フラグメント番号、検出された質量数および質量数から帰属されたアミノ酸配列を示す:

TP1 786.429 G¹EVAPDAK²⁸ (配列番号 34);
 TP2 534.028 F¹⁰⁶PNR¹¹¹ (配列番号 35);
 TP3 1042.15 V¹⁹RGEVAPDAK²⁶ (配列番号 36);
 TP4 1077.29 D⁶⁴GGAWGTEQR⁷³ (配列番号 37);
 TP5 969.466 L¹⁰⁰PDGVEFK¹⁰⁷ (配列番号 38);
 TP6 3021.11 D³⁷SNNLG⁴³LHFNPR⁴⁸ (配列番号 39) +F⁴⁹NAHGDANTIVC⁶⁰NSK⁶³ (配列番号 40);
 TP7 878.451 S²⁸FVLNLGK³⁶ (配列番号 41);
 TP8 1785.14 L¹¹²NLEAINTYMAADGDFK¹²⁷ (配列番号 42);
 TP9 5222.08 A¹C²GLVASNLNLKPGCEC¹⁶LR¹⁸ (配列番号 43)
 +E¹⁴AVFPFQPGSVAEVC⁸⁸ITFDQANLTVK⁹⁹ (配列番号 44)
 +C¹³⁰VAFD¹³⁴ (配列番号 45)。

この結果より大腸菌発現 Gal1 (1-134) (約 45%のアセトニトリル濃度で溶出された画分) は 3 組の SS 結合で架橋しており、その 1 組は Cys42-Cys60 であること、また Cys88 および Cys130 もそれぞれ Cys2 か Cys16 のいずれかと架橋していることが判明した。そこで残りの 2 組の SS 結合架橋様式の同定を行うため、TP9 にリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬社製、日本国) を加え 2 次消化を行った。TP9 を速心エバポ

レーション後、リジルエンドペプチダーゼ (和光純薬社製、日本国) 20pmol を加え、100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 20 μl 中にて 37℃、16 時間の消化を行った。その後、消化液中に存在しているペプチドフラグメントを展開溶媒 A に 0.05% TFA、展開溶媒 B に 0.02% TFA を含むインソロパノール:アセトニトリル=7:3 の混液を用いて、Symmetry C18 逆相カラム (ウオーターズ社製、φ2.0mm x 50mm) で、カラム温度 40℃、流速 0.25ml/min、1% から 50% B を 50 分の直線濃度勾配にて展開することにより分取した (図 6)。得られたペプチドフラグメントを速心エバポレーションした後、MALDI-TOF 型質量分析計 (パーセプティブ社製、Voyager Elite) により質量分析を行った。以下に、フラグメント番号、検出された質量数および質量数から帰属されたアミノ酸配列を示す:

TPAP1 1755.31 A¹C²GLVASNLNLK¹² (配列番号 46)
 +C¹³⁰VAFD¹³⁴ (配列番号 47);
 TPAP2 3484.21 P¹³GEC¹⁶LR¹⁸ (配列番号 48)
 +E¹⁴AVFPFQPGSVAEVC⁸⁸ITFDQANLTVK⁹⁹ (配列番号 49)。

この結果より残りの 2 組の SS 結合架橋様式は Cys2-Cys130 および Cys16-Cys88 であることが同定された。以上より、大腸菌発現 Gal1 (1-134) (約 36%のアセトニトリル濃度で溶出された画分) は 3 組の SS 結合で架橋しており、その架橋様式は Cys42-Cys60、Cys2-Cys130 および Cys16-Cys88 であることが判明した。

同様にして約 34%のアセトニトリル濃度で溶出された大腸菌発現 Gal1 (1-134) についても SS 結合架橋様式の同定を行ったところ、その架橋様式は Cys2-Cys42、Cys16-Cys88 および Cys60-Cys130 のフォームと Cys2-Cys60、Cys16-Cys88 および Cys42-Cys130 のフォームの混合物であった。

実施例 1.4

大腸菌発現 Gal1 (1-134) のレクチン活性測定

ガレクチンは一般に動物レクチンと呼ばれる蛋白質のファミリーに属

し、 β -ガラクトシドを含む糖類に結合する。そこで大腸菌発現 Gall (1-134) がレクチン活性 (β -ガラクトシド結合活性) を有するかどうかを β -ガラクトシドをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーおよび赤血球凝集活性測定法の二つの方法で確認した。

(1) β -ガラクトシドをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー

実施例 12 で取得した大腸菌発現 Gall (1-134) を展開溶媒 A に PBS、展開溶媒 B に 0.1M ラクトースを含む PBS を用い、0% B で平衡化したラクトースアガロースカラム (ホーネン社製、 $\phi 5.0 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$) に、流速 0.5ml/min で 4℃ にて注入した。注入終了後、0% B から 100% B まで 30 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 2ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、素通り画分に分子量 14500Da の Gall (1-134) が検出された。また同一のサンプルを 5mMDTT で室温、2時間の還元処理をした後にラクトースアガロースカラムに注入したところ、Gall (1-134) は素通り画分ではなく、約 10mM のラクトース濃度を有する画分に溶出された。この結果より、大腸菌発現 Gall (1-134) は β -ガラクトシド (ラクトース) に結合することはできないが、還元処理により β -ガラクトシド結合活性が回復することが確認された。

(2) 赤血球凝集活性の測定

ウサギ保存血液 (コスモバイオ社製) 1ml に 5ml の PBS を加え、2000G で 5 分間遠心後、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返し、赤血球画分を得た。この赤血球画分 100 μl に 4.9ml の PBS を加え、2% 血球浮遊液とした。96 穴タイタープレート (U 底) の 1 列目に実施例 12 で取得した大腸菌発現ヒトガレクチン-1 (PBS で 50 $\mu\text{g/ml}$ に希釈)、50 μl を入れ、2 列目以降に 0.39 $\mu\text{g/ml}$ (各 50 μl) までの 2 倍希釈系列を作製した。各ウェルに 2% 血球浮遊液を 50 μl ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。この時、コンカナバリン A および 5mMDTT で室温、2 時間の還元

処理をした大腸菌発現 Gall (1-134) も同一の希釈系列を作製し、同時に赤血球凝集活性の測定を実施した。その結果、コンカナバリン A および 5mMDTT で室温、2 時間の還元処理をした大腸菌発現 Gall (1-134) はいずれも 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度において赤血球凝集活性が検出されたが、実施例 12 で取得した大腸菌発現 Gall (1-134) (非還元) は 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても赤血球凝集活性が検出されなかった。(図 7)

以上の β -ガラクトシドをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーおよび赤血球凝集活性測定法の二つの結果より、実施例 12 で調製した SS 結合を有する Gall (1-134) はレクチン活性を持たないことが確認された。

実施例 15

抗 Gall (1-134) 抗血清の取得と精製

大腸菌発現 Gall (1-134) を抗原としてウサギに免疫し、ウサギ抗 Gall (1-134) 抗血清を取得した。抗原は実施例 12 に記載した TSKgel SP-5PW カラム (東ソー社製) により精製した大腸菌発現 Gall (1-134) を使用した。免疫はウサギ 2 羽を使用し、Gall (1-134) と油性アジュバントにてエマルジョンを作製後、1 羽あたり 20-200 μg を約 2 ケ月間にわたり計 6 回皮下投与した。免疫終了後、全採血を行い、1 羽あたり血清約 75ml を取得した。抗原を固相化したプレートを用いた ELISA による力価測定では、得られた抗血清は 204800 倍希釈まで有意な値を示し、特異性の高い、良好な抗血清が取得された。

取得された抗血清をブロテイン A カラムにより精製し、イムノグロブリン (IgG) 画分を調製した。10ml の抗血清を 10ml の PBS で 2 倍希釈後過剰し、PBS で平衡化した HiTrap Protein A カラム (ファルマシア社製、1ml ゲル) に注入した。20ml の PBS で洗浄後、5ml の 100mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.7) で吸着画分を溶出した。この時、予め 500 μl の 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を分注しておいたチューブを使用した。素通り画分および吸着画分を電気泳動により分析したところ、吸

層面分には IgG だけが検出された。一方、素通り画分にも IgG が含まれていたため、素通り画分を再び上記の方法で精製した。電気泳動により分析したところ、2 回目の素通り画分にも IgG が含まれていたため、いまま一度上記の方法で精製した。計 3 回実施した吸着画分を合わせ (16.5 ml)、2L の PBS で一晩透析し、抗 Gall (1-134) IgG (約 30mg) を取得した。(クローマジー-色素結合法による蛋白定量値)

実施例 1.6

抗 Gall (1-134) IgG カラムの作製

実施例 1.5 で取得した抗 Gall (1-134) IgG を樹脂に固定化し、抗 Gall (1-134) IgG カラムを作製した。2mg/ml の濃度の抗 Gall (1-134) IgG 溶液、5ml を 10000 カット限外濾過膜 (ミリポア社製) を用いて濃縮と同時にカッピングバッファ (0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.2M 炭酸水素ナトリウム、pH8.3) 1ml に置換した。HiTrap NHS-activated (ファルマシア社製、1ml ゲル) カラムを 6 ml の 1mM 塩酸で洗浄後、上記の IgG 溶液 1ml を注入し、室温で 30 分間放置した。その後、カラムを 3ml のカッピングバッファで洗浄後、洗浄用バッファ A (0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M エタノールアミン、pH8.3) および洗浄用バッファ B (0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸ナトリウム、pH4.0) 6ml ずつで洗浄し、さらに 6ml の洗浄用バッファ A を注入し、室温で 30 分間放置した。その後、カラムを洗浄用バッファ B、洗浄用バッファ A、洗浄用バッファ B、PBS の順でそれぞれ 6ml ずつ洗浄し、抗 Gall (1-134) IgG カラムの作製が完了した。

実施例 1.7

COSI 細胞発現 Gall (1-134) の精製と SS 結合架橋様式の同定

COSI 細胞で発現し、培養上清中に分泌された Gall (1-134) の SS 結合架橋様式の同定を行うため、実施例 1.0 に記載した還元処理後のラクトースアガロースカラムによる精製法を用いない精製方法で COSI 細胞

培養上清より Gall (1-134) の精製を行った。実施例 9 で取得したヒトレクチン-1cDNA を組み込んだプラスミド pEFGall を実施例 7 に記載した方法により COSI 細胞へトランスフェクションし、培養上清 250ml を取得した。これを PBS で平衡化した実施例 1.6 で取得した抗 Gall (1-134) IgG カラムにベリスタルティックポンプ (ファルマシア社製、P-1 型) を用いて、4℃にて 0.5ml/ml の流速で注入した。50ml の PBS で洗浄後、3ml の 100mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.7) で吸着画分を溶出した。この時、予め 300 μ l の 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を分注しておいたチューブを使用した。吸着画分を電気泳動により分析したところ、分子量 14500Da の Gall (1-134) と思われるバンドが検出されたため、この画分 (3.3ml) を次のステップに進めた。抗 Gall (1-134) IgG カラム吸着画分 (3.3ml) を展開溶媒 A に 0.1M TFA、展開溶媒 B に 0.1M TFA を含む 80% アセトニトリルを用い、40% B で平衡化した YMC PROTEIN RP カラム (YMC 社製 ϕ 4.6mm x 150mm) に、流速 0.5ml/min で室温にて注入した。注入終了後、40% B から 55% B まで 45 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 0.5ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 38% のアセトニトリル濃度を有する画分 (Fr35) に分子量 14500Da の Gall (1-134) と思われるバンドだけが検出された。そこでこの画分の 0.5 μ l を用いて実施例 1.3 に記載した方法で MALDI-TOF 型質量分析計 (パーセプティブ社製、Voyager Elite) による質量分析を行った。

その結果、このバンドの分子量は 14522.1Da であった。還元状態の Gall (1-134) の分子量 (14583.4Da) と比較するとこのバンドは N 末端がアセチル化され、SS 結合が形成された Gall (1-134) であることが判明した。これにより、COSI 細胞で発現し、培養上清中に分泌された Gall (1-134) の精製が完了した。

質量分析の結果より培養上清中に分泌された Gall (1-134) は SS 結合で架橋されていることが推測されたため、その架橋様式の同定を行った。実施例 1.3 に記載した方法に従い、トリプシンおよびリシルエン

ドペプチダーゼによる酵素消化を行い、得られたフラグメントの質量分析を行うことにより、それぞれのフラグメントの帰属を行った。その結果、COSI 細胞で発現し、培養上清中に分泌された Gall (1-134) の SS 結合架橋様式は Cys42-Cys60、Cys2-Cys130 および Cys16-Cys88 であることが判明した。この架橋様式は、実施例 13 に記載した大腿筋発現 Gall (1-134) (約 36%のアセトニトリル濃度で溶出された画分) のそれと同一であった。

実施例 18

坐骨神経損傷モデル実験

chloral hydrate 麻酔下に、成熟 BALB/c マウス (雌、3-6 週令) の坐骨神経を大腿部で露出させ、切断した。切断端中枢側 7mm の部位に forceps で損傷を加えた。osmotic minipump (Alzet, model 2002、2 週間用または model 2001、1 週間用) を背部の皮下に置き、ポンプに接続されたポリエチレン製チューブの中に坐骨神経切断端中枢側を挿入した。minipump にはあらかじめ生理食塩水で 5 μ g/ml の濃度にした Gall (1-134) 溶液を 220 μ l 満たして置き、1.0 または 0.5 μ l/h の速度で 14 日間または 7 日間溶液を神経切断端に持続的に送り込んだ。2 週間モデルには損傷部位から切断端まで凍結損傷を追加した。損傷後 7 日目、14 日目に 4% paraformaldehyde にて灌流固定を行い、坐骨神経を摘出した後に 2、5% グルタルアル固定を追加した。オスミウムによる後固定の後にエポキシ包埋し、超薄切片を作製して電子顕微鏡にて観察した。損傷部位から 6mm 遠位側、切断端すなわち溶液投与部位から中枢側 1mm の部位を電子顕微鏡で観察した。

7 日目では、コントロールに比べて Gall (1-134) 投与群ではミエリン食細胞数の増加と髄鞘再生過程初期像と考えられる再生軸索数の増加傾向がみられ、早期のミエリンの破壊と神経再生の進行を示した。14 日目では、コントロール群では変性ミエリンが多数残存し再生有髄神経がほとんど見られなかった (図 8B)。これに対して、Gall (1-134) 投

与群ではミエリン食細胞、変性ミエリンともに減少し、再生有髄神経束の間にうすくミエリネーション (remyelination) した再生有髄神経が多数みられた (図 8A)。これらの所見は、Gall (1-134) 投与による損傷神経の再生促進効果を示している。

実施例 19

末梢神経切断再生実験用コラーゲンゲルシリコンチューブの調製と末梢神経切断再生実験

外径 1.5mm、内径 1mm、長さ 7mm の滅菌シリコンチューブの一端を滅菌ガラスビーズで閉じた。0℃の条件下でラットの尻尾より抽出した 0.1% 酢酸に溶解されているコラーゲン溶液 (0.3%) 0.8ml に 500ng/ml の Gall (1-134) を 10 μ l、10 倍濃度の MEM (GIBCO, Minimum Essential Medium) 0.1ml、pH 調整液 (Hepes 0.477g を 0.3N NaOH 10ml に溶解) 0.1ml を順次加えた。コントロールコラーゲン溶液は Gall (1-134) を加えないと同様に調製した。氷上でシリコンチューブ内にそれぞれのコラーゲン溶液を充填し、37℃に加温しコラーゲンをゲル化し、コラーゲンゲルシリコンチューブを作製した。

10-11 週齢 Wistar rat 雄を Pentobarbital (50mg/ml を 0.3ml) にて麻酔し、大腿部を切開し坐骨神経を露出させ、腓骨神経と脛骨神経とに分離した。Gall (1-134) を含むコラーゲンゲルシリコンチューブとコントロールのコラーゲンゲルシリコンチューブを用意し、左の腓骨神経に Gall (1-134) 入りチューブの開口部を近位側にして平行に並べ両端を糸にて筋肉に固定した。腓骨神経を切断し中枢側切断端をシリコンチューブ内に入れ縫合糸にて神経線維をチューブに固定。切開部を縫合した。同様に右の腓骨神経を切断し、コントロールチューブを装着した。Gall (1-134) 入りチューブとコントロールチューブの装着は 1 匹ごとに左右を入れ替えて行った。7 日及び 10 日飼育後ラットを Pentobarbital 麻酔し zamboni 固定液にて灌流固定し、移植チューブを摘出した。チューブは 4% パラフォルムアルデヒドによる固定後

Cryostatにて longitudinal 或いは cross の凍結切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン (H E) 染色及び抗ニューロフィラメント (NF) 抗体、抗 S100 抗体により免疫染色を行った。longitudinal 切片の H E 染色像及び抗 S100 抗体、抗 NF 抗体による免疫染色像から、シリコンチューブ内の神経線維切断端から S100 陽性のシユワン細胞の遊走距離並びに NF 陽性の再生神経突起の伸長距離を測定した。cross 切片から NF 陽性の再生神経突起数を計測した。

HE 染色の結果から神経切断端からのゲル内へ遊走した細胞の移動距離を測定した。図 9 に見られるようにコントロールに比べて Gall(1-134)により遊走細胞の移動距離が伸ばされた。表 1 に示すように術後 7 日目では平均移動距離がコントロールで 0.7mm に対して Gall(1-134)投与群で 1.1mm、術後 10 日目ではコントロールで 1.2mm に対して Gall(1-134)投与群で 1.9mm で、Gall(1-134)投与によって細胞遊走が促進された。S100 陽性のシユワン細胞は遊走細胞の主な細胞で再生先端にまで達しており、図 10 に見られるように NF 陽性の再生神経突起はそのシユワン細胞の位置まで伸長していた。またその神経突起数も Gall(1-134)により増加しているのが見られた。この再生神経突起数を切断端から 0.5mm、1.0mm の 2 点の cross section された切片で測定したのが表 2 である。

切断端から 0.5mm での再生神経突起数の平均値はコントロールで 241 に対して Gall(1-134)投与群で 882、更に切断端から 1.0mm の位置ではコントロールで 52 に対して Gall(1-134)投与群で 302 と再生神経突起数が有意に増加した。以上の結果 Gall(1-134)投与群では神経切断端からのシユワン細胞を主体とした細胞遊走を促進、同時に再生神経突起の伸長を促進し本数を増加させた。Gall(1-134)投与群では in vivo における神経再生促進因子として有用であることが明らかとなった。

表 1. 切断端からの遊走細胞移動距離

日数	例数	切断端からの遊走細胞平均移動距離 (mm)
コントロール	day7	11
	day10	8
		0.7±0.2
		1.2±0.4
Gall(1-134)	day7	5
	day10	7
		1.1±0.1
		1.9±0.5
unpaired Student's t-test day7:p<0.001 day10:p<0.01		

表 2. ニューロフィラメント陽性神経突起数

test number	切断端からの距離		
	0.5 mm	1.0mm	
コントロール	No.134	126	30
	No.135	173	44
	No.158	489	167
	No.159	157	41
	No.161	242	68
	No.164	395	0
	No.182	108	0
	平均	241±135	52±52
Gall(1-134)	No.139	884	555
	No.160	444	126
	No.163	387	86
	No.171	1374	795
	No.174	432	137
	No.175	1766	114
	平均	882±525	302±273
unpaired Student's t-test			0.5mm: p<0.01 1.0mm: p<0.05

実施例 2.0

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とヒトガレクチン-1 (アミノ酸 1-134) の融合蛋白質 (以下、この融合蛋白質を「GST-Gall (1-134)」と称す) の大腸菌発現ベクターの構築

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク発現ベクターである pGEX-5X-2 (ファルマシア社製) によって、GST-Gall (1-134) を発現させるために、次のことを行った。まず、pEGGall を鋳型として、2本のPCR用プライマー-HLEG11、HLEG13を用いてPCRを行った (94℃ 5分間の後に、94℃ 30秒間/60℃ 30秒間/72℃ 1分間の合成条件で25回の反応を行い、さらに72℃で5分間反応させる)。増幅された断片を BamHI と NotI で消化後0.8%のアガロースゲルで泳動し、約420bpの大きさの断片を回収してブレップ-A-ジェン DNA 精製キットで精製し、BamHI、NotI で消化した pGEX-5X-2 に挿入 (宿主は E. coli DH5α を使用した) した。正しいヒトガレクチン-1 cDNA の塩基配列 (ベクターの BamHI から NotI までの塩基配列を配列番号8に示す) を有するクローニング pGEXGall (1-134) を、塩基配列の解析により選択し、これを GST-Gall (1-134) 発現用の形質転換体とした。ここで用いたPCR用プライマーの配列は以下の通りである：

HLEG11 : 5' - GAGAGAGGATCCCATGGCTGTGTCGCGC - 3' (GENBANK
ACCESSION NO. J04456 の50-69の5'端に BamHI サイトを付加し、イン
フレームで GST-Tag につながるようにした；配列番号50) ；
HLEG13 : 5' - AGAGTGGCGCGCTTATCAGTCAAGGCCACACATTG - 3' (GENBANK
ACCESSION NO. J04456 の436-457の相補鎖の5'端に NotI サイトを付
加した；配列番号51) 。

この発現プラスミドは、GST タンパクに続いてファクターXa 認識配
列、及びヒトガレクチン-1 (アミノ酸 1-134) をコードする配列を含
んでいる [ファクターXa 認識配列からヒトガレクチン-1 (アミノ酸 1-
134) に至るアミノ酸配列を配列番号9に示した。]。

実施例 2.1

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とアミノ酸 2 (Cys) を
Ser に変換したヒトガレクチン-1 (アミノ酸 1-134) の融合蛋白質 (以
下、この蛋白質を「GST-Gall (2/Ser)」と称す) の大腸菌発現ベ
クターの構築

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク発
現ベクターである pGEX-5X-2 (ファルマシア社製) によって、GST-
Gall (2/Ser) を発現させるために、次のことを行った。まず、pGEXGall
(1-134) を鋳型として、2本のPCR用プライマー-HLEG15、HLEG23を用
いてPCRを行った (94℃ 5分間の後に、94℃ 30秒間/55℃ 30秒間/
72℃ 1分間の合成条件で25回の反応を行い、さらに72℃で5分間反応
させる)。増幅された断片を BamHI と NotI で消化後2%のアガロース
ゲルで泳動し、約420bpの大きさの断片を回収してブレップ-A-ジェ
ン DNA 精製キットで精製し、BamHI、NotI で消化した pGEX-5X-2
に挿入 (宿主は E. coli DH5 を使用した) した。塩基番号56 (GENBANK
ACCESSION NO. J04456) が A、塩基番号58 (GENBANK ACCESSION NO.
J04456) が C に変換されたヒトガレクチン-1 cDNA の塩基配列を有す
るクローニング pGEXGall (2/Ser) (ベクターの BamHI から NotI までの塩
基配列は15位のTがA、17位のTがCに変わっている以外は配列番号
8に同じ) を、塩基配列の解析により選択し、これを GST-Gall (2/Ser)
発現用の形質転換体とした。ここで用いたPCR用プライマーの配列は
以下の通りである：

HLEG15 : 5' - GAGAGAGGATCCCATGGCTGTGTCGCGC - 3' (配列番号
52； GENBANK ACCESSION NO. J04456 の50-68の5'端に BamHI サイト
を付加し、インフレームで GST-Tag につながるようにした。また、塩基
番号56をA、塩基番号58をCに変換した。) ；
HLEG23 : 5' - AGAGCGCGCGCTTATCAGTCAAGGCCACACATT - 3' (配列
番号53； GENBANK ACCESSION NO. J04456 の437-457の相補鎖の5'端
に NotI サイトを付加した)。

この発現プラスミドは、GST タンパクに続いてファクター-Xa 認識配列、及び変異型ヒトガレクチン-1 をコードする配列を含んでいる（ファクター-Xa 認識配列から変異型ヒトガレクチン-1 に至るアミノ酸配列は 10 位の Cys が Ser に変わっている以外は配列番号 9 に同じである）。

実施例 2.2

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と全ての Cys を Ser に変換したヒトガレクチン-1 (アミノ酸 1-134) の融合蛋白 (以下、この蛋白質を「GST-Gal1 (all/Ser)」と称す) の大腸菌用発現ベクターの構築

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク発現ベクターである pGEX-5X-2 (ファルマシア社製) によって、GST-Gal1 (all/Ser) を発現させるために、次のことを行った。ヒトガレクチン内には、6 つの Cys が存在するが、まず配列番号 1 の 130 位の Cys を Ser に変換するため、2 本の合成オリゴマー-HLEG21, HLEG22 をアニーラル (99℃ 5min/80℃ 5min/70℃ 5min/60℃ 5min/50℃ 5min/40℃ 5min/30℃ 5min) させ、EcoRI, NotI で消化した pGEX-5X-2 に挿入 (宿主は E. coli DH5 を使用した) した。ヒトガレクチン-1 cDNA の塩基番号 366 (GENBANK ACCESSION NO. J04456) に位置する EcoRI から下流の塩基配列のうち、塩基番号 440 (GENBANK ACCESSION NO. J04456) の T が A に、塩基番号 442 (GENBANK ACCESSION NO. J04456) の T が C に変換された配列を有するクロニン pGEXGal1(all/Ser-3') (EcoRI サイトから NotI サイトまでを配列番号 10 に示す) を、塩基配列の解析により選択した。ここで用いた合成オリゴマーの配列は以下の通りである:

HLEG21: 5' -

AATCAAGTTCCCAACCCCTCAACCTGGAGCCATCACTACATGGCAGCTGACGGTGACTT
CAAGATCAAAAGCGTGGCTTTGACTGATAAGC-3' (配列番号 54; GENBANK
ACCESSION NO. J04456 の 366-457 の 3'端に NotI サイトを付加した。

また、塩基番号 440 の T は A、442 の T は C に変更。))

HLEG22: 5' -

GGCCGCTTATCAGTCAAAAGCCACGCTTTTGATCTTGAAGTCACCTCAGCTGCCGTGTTG
ATGGCTCCAGGTTGAGCGGTTGGGAACTTG-3' (配列番号 55; GENBANK
ACCESSION NO. J04456 の 370-457 の相補鎖の 5'端に NotI サイトを付
加した。また、塩基番号 440 のアンチセンスである A は T、442 のアン
チセンスである A は G に変更。))

残りの 5 つの Cys を Ser に変換するため、次のことを行った。
pGEXGal1(1-134) 2ng をテンプレートとし、合成したプライマー (HLEG16
及び HLEG18) 各 5pmol を用いて PCR を行なった。 AmpliTaqTM DNA
Polymerase (パーキンエルマー社製) を使用して、GeneAmpTM PCR System
2400 (パーキンエルマー社製) により 50μl の容量で PCR (94℃ 5 分
間の後に、94℃ 30 秒間/72℃ 2 分間の合成条件で 25 回の反応を行い、
さらに 72℃ で 5 分間反応させる) を行った。また、 pGEXGal1(1-134)
を鋳型として、合成したプライマー (HLEG17 及び HLEG20) 各 5pmol を
用いて同条件で PCR を行なった。上記 2 種類の反応液を混合した後 PCR
反応 (94℃ 30 秒間/72℃ 2 分間の合成条件で 5 回) を行い、この反応
液 1μl をテンプレートとして合成したプライマー (HLEG15 及び
HLEG19) 各 20pmol を用いて PCR (100μl の容量で、94℃ 30 秒間/55℃
30 秒間/72℃ 1 分間の合成条件で 25 回の反応を行い、さらに 72℃ で 5
分間反応させる) を行った。増幅された断片を EcoRI と BamHI で消化後
2% のアガロースゲルで泳動し、約 330bp の大きさの断片を回収してブ
レップ-A-ジーン DNA 精製キットで精製し、EcoRI, BamHI で消化し
た pGEXGal1(all/Ser-3') に挿入 (宿主は E. coli DH5 を使用した) した。
全ての Cys を Ser に変換したヒトガレクチン-1 の塩基配列を有するク
ロニン pGEXGal1 (all/Ser) (ベクターの BamHI から NotI までの塩基配
列は 15 位の T が A、17 位の T が C、57 位の T が A、135 位の T が A、189
位の T が A、273 位の T が A、399 位の T が A、401 位の T が C に変わっ
ている以外は配列番号 8 に同じ) を塩基配列の解析により選択した。こ

こで用いたPCR用プライマーの配列は以下の通りである：

HLEG16 : 5' -
ATGGCTAGCGGTCTGGTCCGAGCAACCTGAATCTCAAAACCTGGAGAGCCTTGG-3'
(配列番号 56 ; GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 50-105. また、塩
基番号 56 を A、塩基番号 58 を C、塩基番号 98 を A に変換した。) ;
HLEG17 : 5' -
ACCTGAGCTGCACCTTCAACCCCTCGCTTCAAGCCGACGGCGGCAACACCATCGTGAGCAA
C-3' (配列番号 57 ; GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 171-235.
また、塩基番号 176 を A、塩基番号 230 を A に変換した。) ;

HLEG18 : 5' -
GTTGCTCAGCATGGTGTGGCGTCCGCGGTGACCGAGGGTTGAAGTCAGGCTCAGG
T-3' (配列番号 58 ; GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 171-235 の
相補鎖。また、塩基番号 176 のアンチセンスの A を T、塩基番号 230 の
アンチセンスの A を T に変換した。) ;
HLEG19 : 5' -AACTTGAATTCGTATCCATCTG-3' (配列番号 59 ; GENBANK
ACCESSION NO. J04456 の 354-375 の相補鎖。) ;

HLEG20 : 5' -
AACTTGAATTCGTATCCATCTGCGAGCTTGACGGTCAGGTTGGCTGGTCGAAGGTGATGCTCA
C-3' (配列番号 60 ; GENBANK ACCESSION NO. J04456 の 311-375 の
相補鎖。また、塩基番号 314 のアンチセンスの A を T に変換した。)

この発現プラスミドは、GST タンパクに続いてフアクターXa 認識配
列、及び全ての Cys を Ser に変換したヒトガレクチン-1 をコードする
配列を含んでいる (フアクターXa 認識配列から変異型ヒトガレクチン-
1 に至るアミノ酸配列は、すべての Cys が Ser に変わった以外は配列番
号 9 に同じである)。

実施例 2.3

GST 融合蛋白質 (GST-Gall (1-134)) の大腸菌での発現、フアクタ
ーXa による GST 部分の除去、GlyIleProMet (配列番号 61) が N 末に付

加している Gall (1-134) [GIPM-Gall (1-134)] の精製

実施例 20 で得られたクローンを、アンピシリン 50 µg/ml を含む L
B 寒天培地の上に塗布し、37°C で一晚培養してコロニーを形成させ、この
コロニー 1 個をアンピシリン 50 µg/ml を含む LB 培地 50ml で振盪培養
し、この培養液を初発の OD₆₀₀ が 0.2 となるようにアンピシリン 50 µg/ml
を含む LB 培地 1000ml に加え、OD₆₀₀ が 0.5-0.6 に至るまで 37°C で振
盪培養した。次いで最終濃度が、0.1 mM になるように IPTG (イン
プロピルチオガラクトシド) を添加し、さらに 3 時間振盪培養して、GST
-Gall (1-134) の発現を誘導した。

菌体培養液 1L を 10000G で 30 分の遠心分離を行い、GST-Gall (1-
134) 融合蛋白質発現菌体ペレットを得た。ペレットを 20ml の PBS に懸
濁し、氷冷下にてソニケーションを行い、菌体を破碎した。菌体破碎液
を 10000G で 30 分の遠心分離し、上清中に可溶性蛋白として GST-Gall
(1-134) 融合蛋白質を回収した。回収した上清を PBS で平衡化した
グルタチオン-Sepharose4B カラム (フアルマシア社製 φ3cm x 5cm)
に注入した。展開溶媒を 1mM 塩化カルシウム、100mM NaCl を含む 50mM
トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に換えて十分に洗浄した後、フアクターXa、
400 Unit をカラムに注入し、室温で一晩放置した。一晩放置後、フア
クターXa により切断された GIPM-Gall (1-134) を 1mM 塩化カルシウ
ム、100mM NaCl を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて 1ml/min の
流速で溶出した。溶出液を 3ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分
析を行い、分子量 14500Da の GIPM-Gall (1-134) と思われるバンド
が検出された画分 (12ml) を次のステップに進めた。この画分 (12ml)
を限外濾過ユニット (アミコン社製 ; YM3 膜、直径 25mm) で濃縮し、
さらに 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にバッファー交換した。(最終
液量 3ml) これを展開溶媒 A に 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、展開
溶媒 B に 500mM NaCl を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、0%
B で平衡化した Shodex IEC DEAE825 カラム (昭和電工社製、日本国 ; φ
8mm x 7.5cm) に、流速 0.5ml/min で室温にて注入した。注入終了後、

配列表フリーテキスト

配列番号 10: pGEXGall(all/Ser-3')の EcoRI-NotI
 配列番号 11: NotI 配列を含む cDNA 合成用プライマー
 配列番号 12: EcoRI 配列の付加用アダプター
 配列番号 13: 配列番号 2 のヌクレオチド 52-71 に相補的な配列
 配列番号 14: 配列番号 2 のヌクレオチド 33-51 に相補的な配列
 配列番号 15: pEF18S の配列決定用プライマー
 配列番号 16: 配列番号 3 のヌクレオチド 118-137 に相補的な配列
 配列番号 17: 配列番号 3 のヌクレオチド 36-55 に相補的な配列
 配列番号 18: M13 逆方向プライマー
 配列番号 19: M13(-20)順方向プライマー
 配列番号 20: 配列番号 4 のヌクレオチド 64-83 に相補的な配列
 配列番号 21: T7 プライマー
 配列番号 25: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド配列 15-34
 配列番号 26: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド配列 28-47
 配列番号 27: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 472-491
 に相補的な配列
 配列番号 28: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 463-482
 に相補的な配列で、かつその 5' 側に NotI 部位をもつ配列
 配列番号 29: ヒトガレクチン-1 cDNA を含む pEFG11 クローンを得る
 ためのプライマー
 配列番号 30: ヒトガレクチン-1 cDNA を含む pEFG11 クローンを得る
 ためのプライマー
 配列番号 31: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 436-457
 に相補的な配列で、かつその 5' 側に BamHI 部位をもつ配列
 配列番号 32: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 50-69 で、
 かつその 5' 側に NotI 部位をもつ配列
 配列番号 50: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 50-69 で、

0% B から 60% B まで 60 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 1ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 80mM の NaCl 濃度を有する画分に分子量 14500Da の GIPM-Gall (1-134) と思われるバンドが検出されたため、この画分 (1ml) を次のステップに進めた。この画分 (1ml) を展開溶媒 A に 0.1%TFA、展開溶媒 B に 0.085%TFA を含む 80%アセトニトリルを用い、20% B で平衡化した TSKgel Phenyl-5PW RP カラム(東ソー社製、日本国; $\phi 4.6\text{mm} \times 7.5\text{cm}$)に、流速 0.5ml/min で室温にて注入した。注入終了後、20% B から 80% B まで 40 分の直線濃度勾配で展開した。溶出液を 1ml ずつ分画し、各画分の電気泳動による分析を行ったところ、約 30%のアセトニトリル濃度を有する画分に分子量 14500Da の GIPM-Gall (1-134) と思われるバンドだけが検出され精製は完了した。そこでこのバンドが GIPM-Gall (1-134) であることを確認するため、プロテインシーケンサー (パーキンエルマー社製、492 型) を用いて N 末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、次に示す N 末端アミノ酸配列が検出された (X は未同定である) :

GlylleProMetAlaXGlyLeuValAlaSerAsnLeuAsnLeu (配列番号 62) .

この配列は設計通りの GIPM-Gall (1-134) の N 末端アミノ酸配列に一致しており、TSKgel Phenyl-5PW RP カラムにより精製した蛋白が GIPM-Gall (1-134) であることが確認された。

同様にして実施例 2 1 で得られたクローンを大腸菌で発現し、GST-Gall (2/Ser) を取得後、フアクター-Xa により切断し、2 位の Cys が Ser に置換された GIPM-Gall[GIPM-Gall(2/ser)と称す]を取得した。

同様にして実施例 2 2 で得られたクローンを大腸菌で発現し、GST-Gall (all/Ser) を取得後、フアクター-Xa により切断し、6 位の Cys 全てが Ser に置換された GIPM-Gall[GIPM-Gall(all/ser)と称す]を取得した。

かつその 5' 側に BamHI 部位をもつ配列

配列番号 51: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 436-457 に相補的な配列で、かつその 5' 側に NotI 部位をもつ配列

配列番号 52: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 50-68 で、かつその 5' 側に BamHI 部位をもつ配列

配列番号 53: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 437-457 に相補的な配列で、かつその 5' 側に NotI 部位をもつ配列

配列番号 54: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 366-457 で、かつその 3' 側に NotI 部位をもつ配列

配列番号 55: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 370-457 に相補的な配列で、かつその 5' 側に NotI 部位をもつ配列

配列番号 56: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 50-105 で、かつその 56 位、58 位および 98 位がそれぞれ A、C および A に変換されている配列

配列番号 57: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 171-235 で、かつその 176 位および 230 位がそれぞれ A および A に変換されている配列

配列番号 58: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 171-235 に相補的な配列

配列番号 59: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 354-375 に相補的な配列

配列番号 60: ジーンバンク受託番号 J04456 のヌクレオチド 311-375 に相補的な配列で、かつその 314 位の A が T に置換されている配列

配列番号 61: GalI(1-134)の N 末端に付加されたアミノ酸配列

配列番号 62: GalI(1-134)の N 末端配列

本明細書で引用した全ての刊行物および特許出願の全体を参考として本明細書中にとり込むものとする。

請求の範囲

1. 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するガレクチン-1 又はその誘導体を有効成分として含む、神経損傷、神経変性、神経移植時機能低下を含む神経障害の治療剤。

2. 医薬的に許容可能な担体を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の治療剤。

3. ガレクチン-1 又はその誘導体が、神経突起の再生、神経組織の修復等の神経再生促進作用をもつことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の治療剤。

4. ガレクチン-1 又はその誘導体がレクチン活性をもつことを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の治療剤。

5. ガレクチン-1 又はその誘導体がレクチン活性をほとんど又は全くもたないことを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の治療剤。

6. 誘導体が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 個以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ、神経再生促進作用を有することを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の治療剤。

7. 誘導体が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列とアミノ酸レベルで 80% 以上の相同性を有することを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の治療剤。

8. ガレクチン-1 又はその誘導体の N 末端がアシル化されているこ

とを特徴とする請求項 1～7 のいずれかに記載の治癒剤。

9. N末端がアセチル化されていることを特徴とする請求項 8 に記載の治癒剤。

10. ガレクチン-1 又はその誘導体が水溶性ポリマーと共有結合されていることを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載の治癒剤。

11. 水溶性ポリマーがポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項 10 に記載の治癒剤。

12. ガレクチン-1 又はその誘導体が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中の 2 番目 (Cys2)、16 番目 (Cys16)、42 番目 (Cys42)、60 番目 (Cys60)、88 番目 (Cys88) 及び 130 番目 (Cys130) のシステイン残基のうち少なくとも 16 番目のシステイン (Cys16) と 88 番目のシステイン (Cys88) の間でジスルフィド結合を形成していることを特徴とする請求項 1～3、5～11 のいずれかに記載の治癒剤。

13. ガレクチン-1 又はその誘導体が、(1) Cys16-Cys88, Cys2-Cys130 及び Cys42-Cys60; 又は (2) Cys16-Cys88, Cys2-Cys60 及び Cys42-Cys130; 又は (3) Cys16-Cys88, Cys2-Cys42 及び Cys60-Cys130; のいずれかの組の各システイン間にジスルフィド結合を形成していることを特徴とする請求項 12 に記載の治癒剤。

14. ガレクチン-1 又はその誘導体が、前記 (1)、(2) 及び (3) のうち少なくとも 2 つの組の混合物からなることを特徴とする請求項 13 に記載の治癒剤。

15. 前記混合物が前記 (1) を 50% 以上含有することを特徴とする請

求項 14 に記載の治癒剤。

16. 他の神経栄養因子或いは、該因子を含む傍神経細胞又は細胞外マトリックスをさらに含むことを特徴とする請求項 1～15 のいずれかに記載の治癒剤。

17. 前記細胞外マトリックスが、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン又はスロンポスポンディンであることを特徴とする請求項 16 に記載の治癒剤。

18. 前記傍神経細胞が、シュワン細胞、線維芽細胞、サテライト細胞、マクロファージ又はグリア細胞であることを特徴とする請求項 16 に記載の治癒剤。

19. 生体適合性材料からなるチューブ内に封入されていることを特徴とする請求項 1～18 のいずれかに記載の治癒剤。

20. 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又はその配列とアミノ酸レベルで 90% 以上の相同性のアミノ酸配列を有し、且つ、その配列中の 2 番目 (Cys2)、16 番目 (Cys16)、42 番目 (Cys42)、60 番目 (Cys60)、88 番目 (Cys88) 及び 130 番目 (Cys130) のシステイン残基のうち少なくとも 16 番目のシステイン (Cys16) と 88 番目のシステイン (Cys88) の間でジスルフィド結合を形成している、神経再生促進作用を有する蛋白質。

21. (1) Cys16-Cys88, Cys2-Cys130 及び Cys42-Cys60; 又は (2) Cys16-Cys88, Cys2-Cys60 及び Cys42-Cys130; 又は (3) Cys16-Cys88, Cys2-Cys42 及び Cys60-Cys130; のいずれかの組の各システイン間にジスルフィド結合を形成していることを特徴とする請求項 20 に記載の蛋白質。

図 1

22. 前記 (1)、(2) 及び (3) のうち少なくとも 2 つの組の混合物からなることを特徴とする請求項 21 に記載の蛋白質。

23. 前記 (1) を 50% 以上含有することを特徴とする請求項 22 に記載の蛋白質。

24. N 末端がアシル化されていることを特徴とする請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の蛋白質。

25. N 末端に $\text{Met}^{-1}\text{Lys}^{-1}$ 又は Met^{-1} が付加されていることを特徴とする請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の蛋白質。

26. 水溶性ポリマーと共有結合されていることを特徴とする請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の蛋白質。

27. 水溶性ポリマーがポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項 26 に記載の蛋白質。

28. 請求項 20 ~ 27 のいずれかに記載の蛋白質を含有する物質を、前記蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティークラムに通して前記蛋白質を吸着し、次いでそれらを溶出し、必要に応じてさらに酸化処理にかけることを含む、前記蛋白質の製造方法。

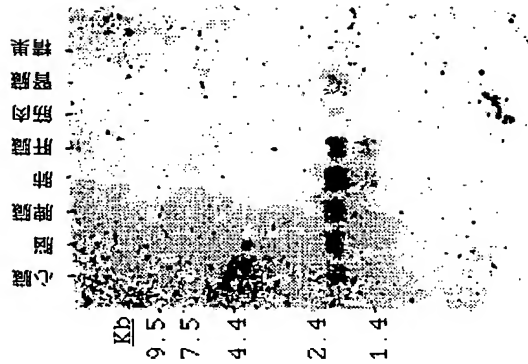


図 2

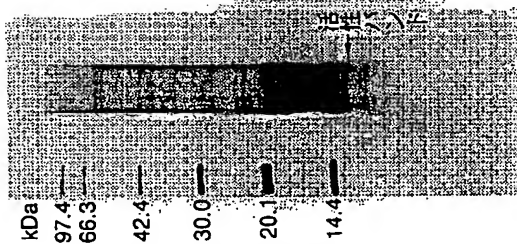


図 3

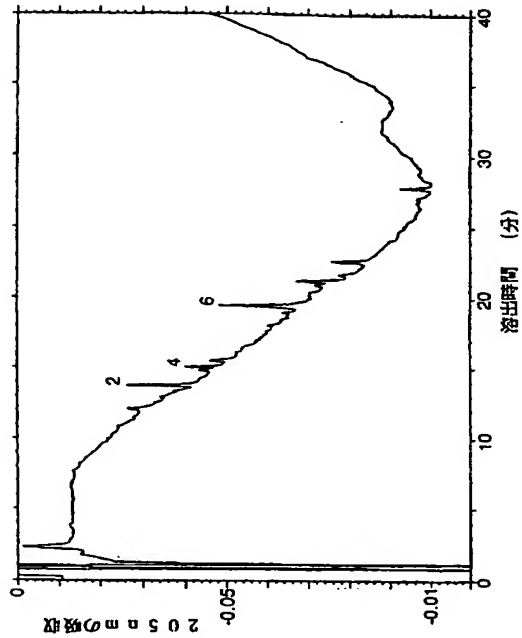
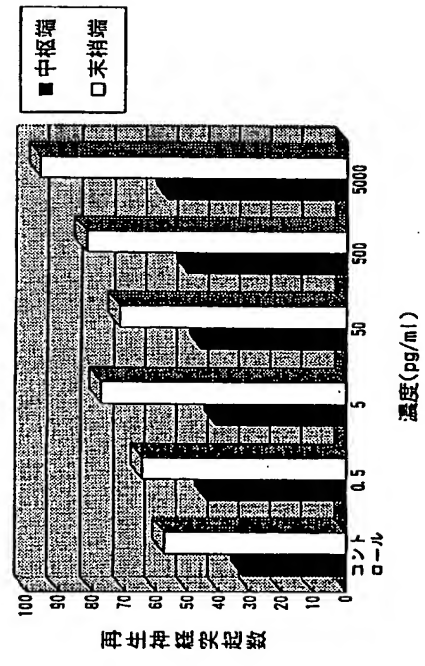


図 4

34%のアセトニトリル溶出画分



36%のアセトニトリル濃度溶出画分

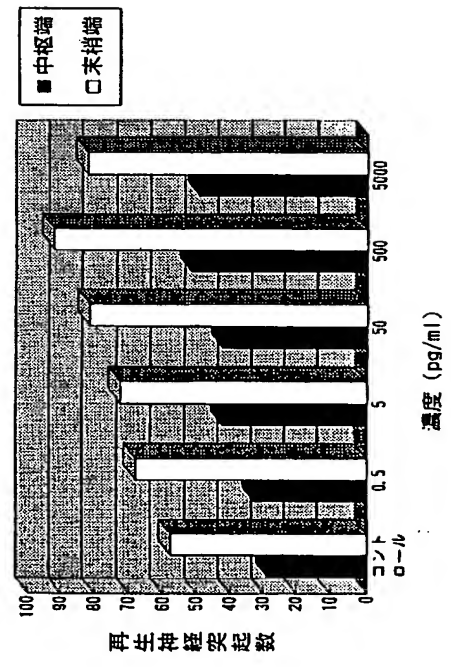


図 5

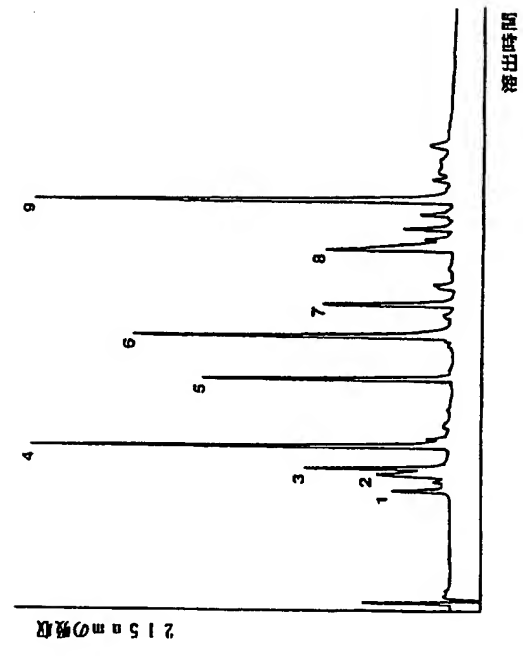


図 6

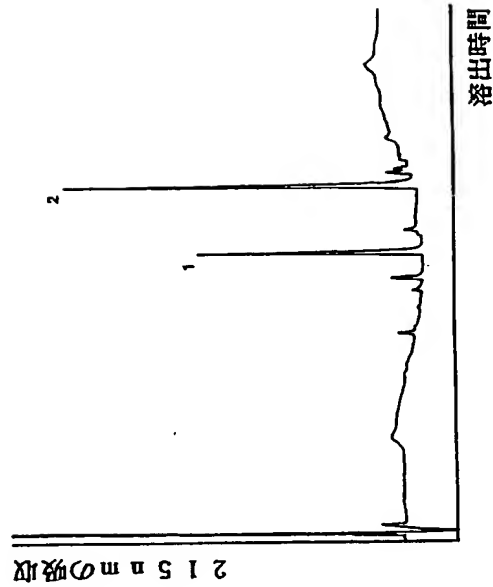
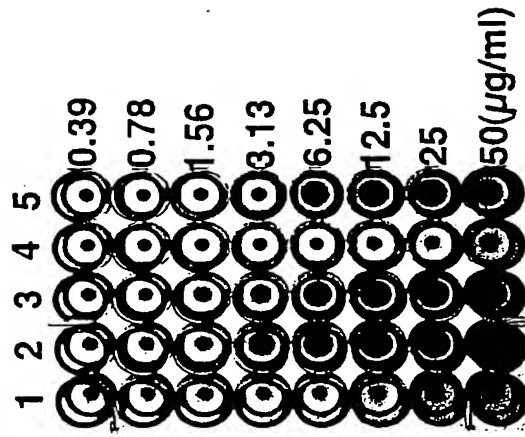


図 7



- 1: PBS
- 2: コンカナバリン A
- 3: 還元処理したコンカナバリン A
- 4: 大腸菌発現 Gal 1 (1-134)
- 5: 還元処理した大腸菌発現 Gal 1 (1-134)

図 9

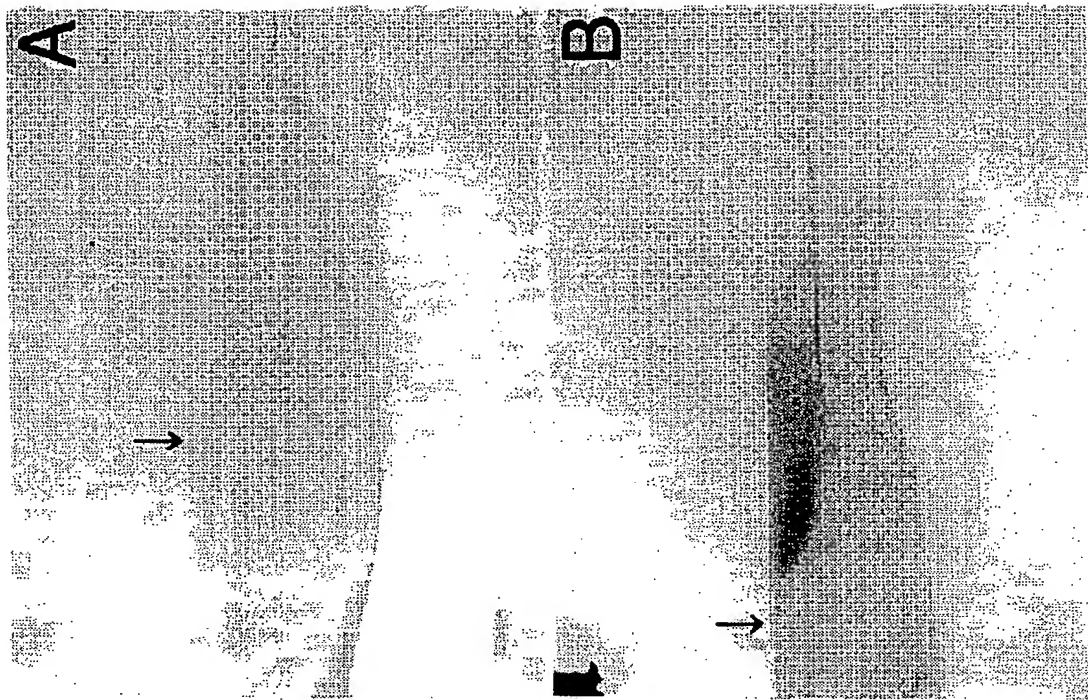


図 8

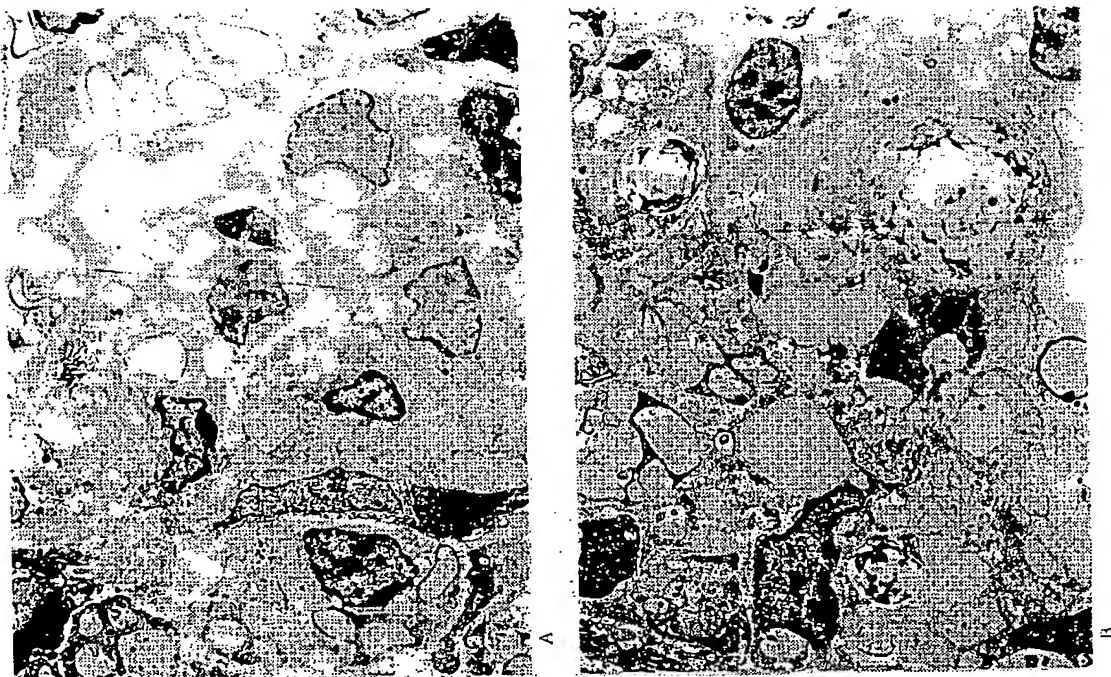
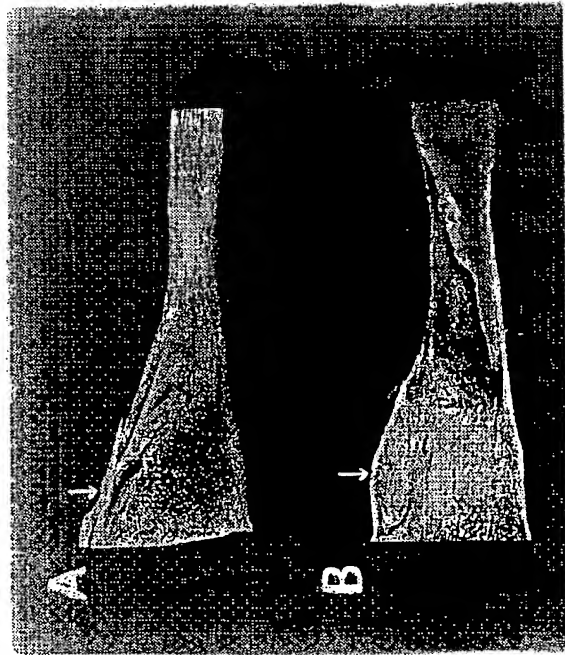


図 10



配列表
Sequence Listing

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Therapeutic agents for neurodisorders comprising galectin-1 or its derivative as an active ingredient

<130> PH-673-PCT

<150> JP 10-218216

<151> 1998-7-31

<160> 62

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu Cys
1 5 10 15
Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu
20 25 30
Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro Arg
35 40 45

Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys Asp

50 55 60

Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe Gln

65 70 75 80

Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn Leu

85 90 95

Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg Leu

100 105 110

Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys Ile

115 120 125

Lys Cys Val Ala Phe Asp

130

<210> 2

<211> 587

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

ggccccctgggt gcttcccccc ctcctctctga ggaaggggcc tctgaagagc atatgagcca 60
aaccitgacca ctaggcttctt ggagccagag aatggggggc algigaaagc cttctcaacc 120
cagtgtccag ccatcttccc tgaagccccc ggggggggag agcaatgcct gcctacacct 180
cacttggggg tgcacagag ggggtccagac tctgaatcct gtgtctggcc cgggaccact 240
ccccagctcc ccatccatcc catgtcatag gtttagagag agcacgtgtg accactggca 300
ttcatttggg ggggtggaga tattggcga agccaccga gccitagtcc ccaggcmeta 360
ggcctggggg ggaagatggg gggctcagga gggggggaagl ctacagaagag ggaaggatct 420
ggagcggggg agggagggcc cagctctgtaa aatactgtac atgcactgct gtatataac 480
tggaatgaat ttctgtaca tgtttgatta atttttttgg tacatgattt ttgtatgttt 540
ccttttcaat aaaaacagat tgaacatga aaaaaaaaaa aaaaaa 587

<210> 3

<211> 332

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 3

acaccctggc cagcgcgggg gactttttct gcaccatgta gcatactgga ctccagacct 60
tgcctgtccc aggggcaggg aagsgaagcc actcgagccc cggcagcccig ggctgactga 120
tggagatacg gacttggggg accctggcct cccaaagcc agsgaagggg gggctgaagg 180
actcatggtg accgaggggg tggggaccga gcggccggcc tcggccggcc accaccatct 240
caggaagggc tgcgtgtgt ggcctggccgt tccagctgca gggggggctc tgggggtgtc 300
cccagtgcgc cttcactttg ggcctggcct ca 332

<210> 4

<211> 335

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

ctagagtgc cgtgtccccc agccccggag gccctggcgg gaggccccac ccagctgtcc 60
ccggagatgc gtgtgggaga ggaagagtgg gccgggaga tccggggcca gctgcggagg 120
atggcgaag accitcaagc gcagtacgag cggcggagac aagaagaga acatcgacac 180
ggacccctgc ccttggaggt catgtataat cttctcatgg gactctctcc cttaaccagg 240
gactctggag cccagaat ggaagccaac taggtgctta caccctccc gggggagctc 300
ggagacttga ggggcaggac cccctcgcc ttctg 335

<210> 5

<211> 317

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

aggctagatt tgacctctgta ttagaatagg ggtacttagg tggataaat tgagggaactt 60
 ccactttgat atgagcttta gttgtaact ggccatlcag gtgacccacag agccacttcc 120
 tcaagacccc ttcttagggc ctgcgggaa gagtgggaaa aagaaattc tatggctgtg 180
 agggagaagcg gaggaaaaag cacagtatag ctacttagtg gctcgcgac gcttcggac 240
 agactgggtg gatgtgacc agccctttt cccctctccc aggtctccag cccctgcgtg 300
 caccagccca gagcac 317

<210> 6

<211> 1571

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

aggctagatt tgacctctgta ttagaatagg ggtacttagg tggataaat tgagggaactt 60
 ccactttgat atgagcttta gttgtaact ggccatlcag gtgacccacag agccacttcc 120
 tcaagacccc ttcttagggc ctgcgggaa gagtgggaaa aagaaattc tatggctgtg 180
 agggagaagcg gaggaaaaag cacagtatag ctacttagtg gctcgcgac gcttcggac 240
 agactgggtg gatgtgacc agccctttt cccctctccc aggtctccag cccctgcgtg 300
 caccagccca gagcaccta ggttcgcccg tgcacagcgc cccggaggcc ctggcgggag 360
 gccctaccca agctgccccg gtagtgcgtg tggaggagga gagtgggcc cggagatcg 420
 ggccccagct gcggaggatg gcgcgcacc tcaacgcgca gtacgagcgg cggagacaag 480
 agagacaaca tgnacccga ccttgccctt ggagggtcat gtataatc tctatgggac 540
 tctctccctt acccagggat ccttgagccc cagaaatgga gcccaactag gtgcctacac 600
 ccgtcccccg ghaactcga gacttgagg gcaggacccc ctccgccttc tgacacctg 660
 gccacgcgg gggacttttt ctgcacatg tagcatatg gactggcagc ctctctgtc 720

4/25

ccaggggcag gcaagggaag ccactcgagc ccggcgagcc tgggtgcact gatggagata 780
 cggacttggg ggaccttggc ctccaaaag ccagggaaggg gagggctgaa ggaactatgg 840
 tgaccgaggg ggtagggacc gagcgccccg cctcggccgc ccaccacctat ctacggaaaag 900
 gcgcgtgtg ctggctgccc gtccagctg caggggggggc tctgggggtg tccccagtgc 960
 gcccttcaatt tgggcccagg ctccagcccc tggctgttcc cccctctctc ctgaggaggg 1020
 ggcccttga gacataiga gccaaacctg accactagcc tcttggagcc agagaaatggg 1080
 gggcaatga aagccttctc aaccagtc ccagccaact tcccigagcc gccggcgggc 1140
 ggtagcaat gccgtgcctca ccttcatctg ggggtgtcca ggggggttcc agacttgaa 1200
 tcttctgtc tggcgggac cactccccca gtccccatcc atccccatgc atagtttag 1260
 agagagcag tgtaccact ggcattcatt tgggggttgg gagatatagg cggaaagccac 1320
 ccagcctta gtccccagg caaagcgtg gggaggaaga tggggagica gggagggggg 1380
 aagcttcaga agagggagga gtctgggagc gggggaggac gcccagcct gtaaatatct 1440
 gtacatgcac tgcgtagat atactggaat gaattttctg tactgtttg gtaattttt 1500
 ttgtacatg attttgtat gtttctttt caataaatc agatigaaca gigaataaaa 1560
 aaaaaaaaa a 1571

<210> 7

<211> 419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccatggcttg tggcttgatc gccagcaacc tgaattcaa acctggagag tgccttcgag 60
 tggagaggga ggtggcttct gacgtctaga gcttctgtct gaaccttggc aaagacagca 120
 acaactgtg cctgcactc aacctctgt tcaacgccca cggcgacgcc aacacctcg 180
 tgtcaacag caaggacgagc ggggcttggg ghaacgagca gggggaggct gcttctccct 240
 tccagcttgg agtgttga gagggtgca tcaacttoga ccaggccacac ctgacgttca 300
 agctgcaga tggatacga ttcaagtacc ccaaccgctt caacttggag gccatcaact 360
 acatggcagc tgacgttacc tcaagaica aatgtgtggc ctttactga taaggatcc 419

5/25

<210> 8

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggatcccat ggttttgtt cttgttcgcca gcaactgaa tctcaaacct ggagatgcc 60
 ttccagtgcc aggcgaggtg gcctctgacg ctaagagctt cgtctgac cttggcacaag 120
 acagcaaaa cctgttcctt cacttcaacc ctgtcttcaa cgtccacggc gacgccaaca 180
 ccatgtgtg caacagcaag gacgcgagg cctgggggac ctagcagcgg gaggctgtct 240
 ttcccttcca gcttggaagt gtgcagagg ttgtcatcac ctccagccag gccaacctga 300
 ccgtcaagct gcagatgga tagcaattca agttcccaa cgcctcaac ctggaggcca 360
 tcaactacat ggcagctgac ggtgacttca agatcaaatg ttggccctt gactgataag 420
 cggccgc 427

<210> 9

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn

1 5 10 15

Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala

20 25 30

Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn

35 40 45

Leu Cys Leu His Phe Asn Pro Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn

6/25

50 55 60

Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys Asp Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln

65 70 75 80

Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys

85 90 95

Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr

100 105 110

Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met

115 120 125

Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys Ile Lys Cys Val Ala Phe Asp

130 135 140

<210> 10

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> EcoRI-NotI of pGEXGall(al1/Ser-3')

<400> 10

gaattcaagt tccccaaccg cctcaacctg gaggccatca actacatggc agctgacggt 60

gacttcaaga tcaaaagcgt ggcctttgac lgataagcgg ccgc 104

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer comprising NotI sequence for synthesis of cDNA

<400> 11

7/25

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttt

45

<210> 12

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Adaptor for addition of EcoRI sequence

<400> 12

aattcgccac gagg

14

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 52-71 of SEQ ID NO:2

<400> 13

gtggtcagggt ttggctcata

20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 33-51 of SEQ ID NO:2

<400> 14

tgctcttcac agggccct

19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer for sequencing pEF18S

<400> 15

ggatcttgggt tcattctcaa g

21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 118-137 of SEQ ID NO:3

<400> 16

ccaagtcctgt atctccatca

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 36-55 of SEQ ID NO:3

<400> 17

ggcagtcctcag tatgctacat

20

<210> 18

<211> 17

8/25

9/25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> M13 reverse primer

<400> 18

caggaacag ctatgac

17

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> M13(-20) forward primer

<400> 19

gtaaaacgac gccacagtg

18

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 64-83 of SEQ ID NO:4

<400> 20

tcctcctcga caccgactcc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10/25

<223> T7 primer

<400> 21

taatacgaact cactataggg

20

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Pro Gly Glu Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala

1

5

10

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 23

Leu Pro Asp Gly Tyr Glu

1

5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

11/25

Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn

1 5 10

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotide sequence 15-34 of GENBANK ACCESSION NO. J04456

<400> 25

tgccctgcc cgggaacatc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotide sequence 28-47 of GENBANK ACCESSION NO. J04456

<400> 26

gaacatctc ctggaactca

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 472-491 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456

<400> 27

tgcatcatt ttaagtcca g

12/25

21

13/25

gctgccttta ttgggggcca

20

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 463-482 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456, with a NotI site at the 5' site of the sequence

<400> 28

gagagagcag ccgcattggg ggccaagggc tggc

34

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer for obtaining the clone pEFG11 containing human galectin-I cDNA

<400> 29

cctcagacag tggttcaag

20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer for obtaining the clone pEFG11 containing human galectin-I cDNA

<400> 30

tgcatcatt ttaagtcca g

21

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 436-457 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456, with a BamHI site at the 5' site of the sequence

<400> 31

agagtggaac cttatcagtc aaagccaca catttg

36

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 50-69 of GENBANK ACCESSION NO. J04456, with an NcoI

site at the 5' site thereof

<400> 32

gagagaccat ggcttggtgtggt ctggtagc

28

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Unsure

<222> (2)

<220>

14/25

<221> Unsure

<222> (16)

<400> 33

Ala Xaa Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Lys Pro Gly Glu Xaa

1 5 10 15

Leu Arg Val Arg

20

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys

1 5

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Phe Pro Asn Arg

1

<210> 36

<211> 10

15/25

<212> PRT	<400> 39
<213> Homo sapiens	Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro Arg
<400> 36	1 5 10
Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys	
1 5 10	
<210> 37	<210> 40
<211> 10	<211> 15
<212> PRT	<212> PRT
<213> Homo sapiens	<213> Homo sapiens
<400> 37	<400> 40
Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg	Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys
1 5 10	1 5 10 15
<210> 38	<210> 41
<211> 8	<211> 8
<212> PRT	<212> PRT
<213> Homo sapiens	<213> Homo sapiens
<400> 38	<400> 41
Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys	Ser Phe Val Leu Asn Leu Gly Lys
1 5	1 5
<210> 39	<210> 42
<211> 12	<211> 16
<212> PRT	<212> PRT
<213> Homo sapiens	<213> Homo sapiens
	<400> 42
	17/25

Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1 5

<210> 49

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Glu Ala Val Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile

1

5

10

15

Thr Phe Asp Gln Ala Asn Leu Thr Val Lys

20

25

<210> 50

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 50-69 of GENBANK ACCESSION NO. J04456, with a BamHI

site at the 5' site thereof

<400> 50

gagagaggat ccccatggct tctgtcttgg tcgc

34

<210> 51

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 436-457 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456, with a NotI site at the 5' site of the sequence

20/25

<400> 51

agagtcgggc cgttatcag tcaaaggcca cacatttg

38

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 50-68 of GENBANK ACCESSION NO. J04456, with a BamHI
site at the 5' site thereof

<400> 52

gagagaggat ccccatggct agcggctctgg tcg

33

<210> 53

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 437-457 of GENBANK ACCESSION
NO. J04456, with a NotI site at the 5' site thereof

<400> 53

agagtcgggc cgttatcag tcaaaggcca cacattt

37

<210> 54

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 366-457 of GENBANK ACCESSION NO. J04456, with a NotI

21/25

site at the 3' site thereof

<400> 54

aattcaagtt cccaaccgc cicaaccctgg aggcacatcaa ctacaigcca gctgaaggig 60

acttcaagat caaaagcgtg gcccttgact tataagc 97

<210> 55

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 370-457 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456, with a NotI site at the 5' site thereof

<400> 55

ggcgccttat cagtcaaaagg ccacgctttt gatcttgaag tcaccgtcag ctgccaigta 60

gttgatggcc tccaggttga ggcggttggg gaacttg 97

<210> 56

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 50-105 of GENBANK ACCESSION NO. J04456 with changes

to A, C and A at the positions 56, 58 and 98 respectively

<400> 56

atggctagcag gtctgtgtcgc cagcaacctg aatctcaaac ctggagagag ccttcg 56

<210> 57

<211> 65

22/25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> The nucleotides 171-235 of GENBANK ACCESSION NO. J04456 with changes
to A and A at the positions 176 and 230 respectively

<400> 57

acctgagcct gcacttcaac cctcgtcttca acgccacacgg cgacgccaac acctcgttga 60

gcaac 65

<210> 58

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 171-235 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456

<400> 58

gtgtctcagc atggtgttgg cgtcgcctgig ggcgttgaag cgagggttga agtgcaggct 60

cagggt 65

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 354-375 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456

<400> 59

aacttgaatt cgtatccatc tg

23/25

22

Gly Ile Pro Met Ala Xaa Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu
1 5 10 15

<210> 60

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Complementary sequence to the nucleotides 311-375 of GENBANK ACCESSION

NO. J04456 with substitution of T for A at the position 314

<400> 60

aacttgaatt cgtatccatc tggcagcttg acggtcaggt tggcctggtc gaagtgatg 60

ctcac 65

<210> 61

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence added to the N-terminus of Gal1(1-134)

<400> 61

Gly Ile Pro Met

1

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> N-terminal sequence of GLPW-Gal1(1-134)

<400> 62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP99/04091
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5693760, A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 2 December, 1997 (02. 12. 97) & WO, 94/11497, A	1-28
A	Kazuko Yamaoka et al., "Structural and Functional Characterization of a Novel Tumor-Derived Rat Galactin-1 Having Transforming Growth Factor (TGF) Activity: The Relationship between Intramolecular Disulfide Bridges and TGF Activity" Journal of Biochem (1996) Vol. 119 No. 5 P.878-886	20-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP99/04091
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. ⁸ C12N15/12, A61K38/17, C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. ⁸ C12N15/12, A61K38/17, C07K14/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
SwissProt/PIR/Geneseg, NPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Beryl M. Tracey et al., "Subunit Molecular Mass Assignment of 14,654 Da to the Soluble β - Galactoside-Binding Lectin from Bovine Heart Muscle and Demonstration of Intramolecular Disulfide Bonding Associated with Oxidative Inactivation" The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol. 267 No. 15 P.10342-10347	20-28
A	Ken-ichi Kasai et al., "Galactins: A Family of Animal Lectins That Decipher Glycocodes" Journal of Biochem (1996) Vol. 119 P.1-8	1-28
A	Samuel H. Barondes et al., "Galactins: A Family of Animal β -Galactoside-Binding Lectins" Cell (1994) Vol. 76 P.597-598	1-28
A	WO, 98/08535, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 5 March, 1998 (05. 03. 98) (Family: none)	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance to the claimed invention cannot be considered relevant if it is not considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 2 September, 1999 (02. 09. 99)		Date of mailing of the international search report 14 September, 1999 (14. 09. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP99/04091	
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl⁴ C12N15/12, A61K38/17, C07K14/47</p>			
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl⁴ C12N15/12, A61K38/17, C07K14/47</p>			
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>			
<p>国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/Geneseg, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)</p>			
C. 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号	
引用文献のカテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		
X	Beryl M. Tracey et al. "Subunit Molecular Mass Assignment of 14,654 Da to the Soluble β -Galactoside-Binding Lectin from Bovine Heart Muscle and Demonstration of Intramolecular Disulfide Bonding Associated with Oxidative Inactivation" The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol. 267 No. 15 P. 10342-10347	20-28	
A	Ken-ichi Kasai et al. "Galactins: A Family of Animal Lectins That Decipher Glycocodes" Journal of Biochem (1996) Vol. 119 P. 1-8	1-28	
<input checked="" type="checkbox"/> C 類の献きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
<p>* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日より後に公表されたもの 「L」 従来例主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、開示等に及ぼす文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>			
国際調査を完了した日 02.09.99		国際調査報告の発注日 94.09.99	
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JPT) 郵便番号 100-8916 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 電話番号 03-35681-1101 内線 3488</p>	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP99/04091	
<p>C (献き): 関連すると認められる文献</p>			
引用文献のカテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号	
A	Samuel H. Barondes et al. "Galactins: A Family of Animal β -Galactoside-Binding Lectins" Cell (1994) Vol. 76 P. 597-598	1-28	
A	WO 98/08535, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 05.3月.1998 (05.03.98) ファミリーなし	1-28	
A	US 5693760, A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 02.12月.1997 (02.12.97) & WO, 94/11497, A	1-28	
A	Kazuko Yamaoka et al. "Structural and Functional Characterization of a Novel Tumor-Derived Rat Galectin-1 Having Transforming Growth Factor (TGF) Activity: The Relationship between Intramolecular Disulfide Bridges and TGF Activity" Journal of Biochem (1996) Vol. 119 No. 5 P. 878-886	20-28	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.